

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-70778

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 N 15/51	ZNA			
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
C 1 2 P 21/02	C	8214-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数33(全 37 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-156087

(22)出願日 平成5年(1993)6月1日

(31)優先権主張番号 特願平4-207391

(32)優先日 平4(1992)7月10日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 591063394

財団法人東京都臨床医学総合研究所
東京都文京区本駒込3丁目18番22号

(71)出願人 000144577

株式会社三和化学研究所
愛知県名古屋市東区東外堀町35番地

(71)出願人 390022998

東燃株式会社
東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社
兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

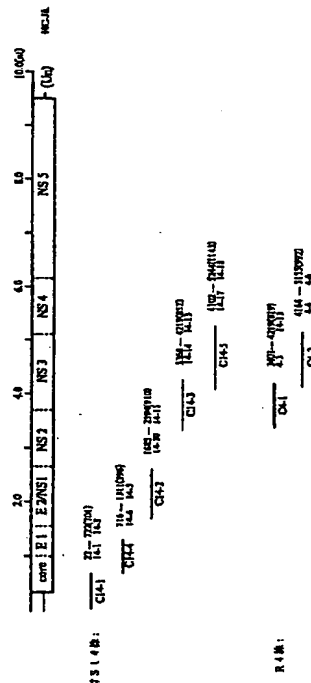
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードする核酸断片

(57)【要約】

【構成】 非A非B型肝炎患者血漿より遺伝子工学的手法により得られた非A非B型肝炎ウイルスの構造及び非構造領域の抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片、具体的には、配列表中配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13及び14に示されるアミノ酸配列の全部又は一部で表わされる非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片、これらの核酸断片を含む発現ベクター、該発現ベクターを含む宿主細胞、該ウイルス抗原(ポリ)ペプチドの製法、並びにその組換えポリ(ペプチド)。

【効果】 非A非B型肝炎患者の診断及び非A非B型肝炎ウイルスキャリアーの検出に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 非 A 非 B 型肝炎患者血漿より遺伝子工学的的手法により得られた非 A 非 B 型肝炎ウイルスの構造及び非構造領域の抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 2】 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 3】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 1 に示されるヌクレオチド番号 1 から 700 までの配列の全部または一部である請求項 2 記載の核酸断片。

【請求項 4】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 5】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 2 に示されるヌクレオチド番号 1 から 909 までの配列の全部または一部である請求項 4 記載の核酸断片。

【請求項 6】 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 7】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 3 に示されるヌクレオチド番号 1 から 852 までの配列の全部または一部である請求項 6 記載の核酸断片。

【請求項 8】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 9】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 4 に示されるヌクレオチド番号 1 から 819 までの配列の全部または一部である請求項 8 記載の核酸断片。

【請求項 10】 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 11】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 5 に示されるヌクレオチド番号 3 から 992 までの配列の全部または一部である請求項 10 記載の核酸断片。

【請求項 12】 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 13】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 6 に示されるヌクレオチド番号 1 から 594 までの配列の全部または一部である請求項 12 記載の核酸断片。

【請求項 14】 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 15】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 7 に示されるヌクレオチド番号 2 から 1141 までの配列の全部または一部である請求項 14 記載の核酸断片。

【請求項 16】 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 17】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 8 に示されるヌクレオチド番号 1 から 1134 までの配列の全部または一部である請求項 16 記載の核酸断片。

【請求項 18】 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 19】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 9 に示されるヌクレオチド番号 2 から 1663 までの配列の全部または一部である請求項 18 記載の核酸断片。

【請求項 20】 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 21】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 10 に示されるヌクレオチド番号 2 から 667 までの配列の全部または一部である請求項 20 記載の核酸断片。

【請求項 22】 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 23】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 11 に示されるヌクレオチド番号 2 から 1120 までの配列の全部または一部である請求項 22 記載の核酸断片。

【請求項 24】 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 25】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 12 に示されるヌクレオチド番号 2 から 1174 までの配列の全部または一部である請求項 24 記載の核酸断片。

【請求項 26】 配列番号 13 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 27】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 13 に示されるヌクレオチド番号 2 から 1057 までの配列の全部または一部である請求項 26 記載の核酸断片。

【請求項 28】 配列番号 14 に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む核酸断片。

【請求項 29】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 14 に示されるヌクレオチド番号 2 から 646 までの配列の全部または一部である請求項 28 記載の核酸断片。

【請求項 30】 請求項 1~29 のいずれか一項に記載の核酸断片が、プロモーターの下流に存在するベクター内のクローニング部位に導入された発現ベクター。

【請求項 31】 請求項 30 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 32】 組換え非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原（ポリ）ペプチドの製造方法であって、

請求項 1~29 のいずれか一項に記載の核酸断片を適当な宿主細胞内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築する工程、

前記発現ベクターを宿主細胞内に導入して形質転換体を

得る工程、

前記核酸断片を発現させ得る条件下で前記形質転換体を培養して前記組換え（ポリ）ペプチドを発現させる工程、及び前記組換え（ポリ）ペプチドを回収する工程を包含する方法。

【請求項33】 請求項32記載の方法により得られる組換え（ポリ）ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、非A非B型肝炎ウイルスの構造及び非構造領域の抗原をコードする核酸断片に関する。本発明はまた、該核酸断片を含む発現ベクター及び該ベクターを含む宿主細胞に関する。本発明はさらに、該抗原（ポリ）ペプチドの製造法及びそれによって得られる組換え（ポリ）ペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】一般にウイルス性肝炎の起因ウイルスとしては主として経口感染するA型肝炎ウイルス、血液を介して感染するB型肝炎ウイルスが広く知られている。また、B型肝炎ウイルスに付随して感染するD型（δ）肝炎ウイルスの存在も知られている。

【0003】これらとは別に、長らく感染性が指摘されながらその病原因子の存在が解からなかった肝炎が存在し、複数のウイルスの存在が示唆されていたが、A型、B型肝炎ウイルスの存在と他の肝炎要因の除外診断によって非A非B型肝炎と総称されていた。この中で最近、経口感染によって肝炎を引き起こす非A非B型肝炎ウイルスが分離同定された。

【0004】一方、主として輸血を介して感染する非A非B型肝炎は、B型肝炎ウイルスがワクチンの開発と、輸血用血液のスクリーニングによってほぼ予防が可能となった現在、輸血後肝炎の90%以上を占め、しかも感染者の50%以上が慢性化し、肝硬変、肝癌への移行率も高い事から重大な問題となっていた。

【0005】本ウイルスについては1989年に米国カイロン社のChoo等が人血漿を感染させたチンパンジーの血漿を試料としてイムノスクリーニング法によってウイルス遺伝子をクローニングし、クローニングされたウイルス遺伝子を基に微生物を用いて発現させた抗原を用いた抗体検査による診断法を開発した（Science 244:359-362 (1989); Science 244:362-364 (1989); 特表平2-500880号公報）。これを契機として、世界中で活発な研究が開始され、ウイルスの全一次構造も明らかにされており（Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9524(1990); Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2451(1991); J. Virol. 65, 1105(1991)）、現在広くHepatitis C virus (HCV) という名称で呼ばれるようになっている。しかし当初カイロン社で開発されたc100-3抗原を用いた試薬では、慢性非A非B型肝炎患者の70~80%しか検出できなかった（飯野四郎ら、医

学と薬学 26(1):87-95, 1991)。しかし、その後米国を初め、日本においても活発にHCV遺伝子のクローニングが行なわれ、ウイルス構造蛋白であるコア抗原を加えた第二世代の試薬の開発により、ほぼ90%の患者を検出することが可能となっている（河合忠ら、臨床検査機器・試薬 14(4):725-733, 1991)。しかしこの改良された第二世代の試薬においても散发性非A非B型肝炎患者においてはその40%程度が検出されるに留まっている。

【0006】一方、HCVの研究の進展と共に、ウイルス遺伝子間でかなり相同性の異なるものの存在が指摘され、少なくとも2種類以上の遺伝子型に分けられるのではないかと考えられるようになりつつある（Virus Gene 5:3, 243(1991); Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10292(1991)）。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述したように、非A非B型肝炎患者のかなりの部分が第二世代の、構造及び非構造領域の抗原を組み合わせたHCV抗体検出試薬によって診断可能となってきたが、依然としてこれらの試薬によって検出できない患者が存在する。この原因が、タイプの異なる非A非B型肝炎ウイルスによるものか、全く別の病原因子によるものかは明らかではない。

【0008】また、インターフェロン投与等の非A非B型肝炎患者の治療法が登場するに伴って、単に抗体を検出するばかりでなく、治療効果の判定の為に、より意義のある遺伝子や抗原の測定が強く望まれている。ところが、非A非B型肝炎ウイルスにはタイプの異なるグループが存在することが明らかにされつつあり、また特にエンベロープと推定される領域においてはかなりの多様性を持つことも明らかにされつつある。ウイルス感染の指標としての抗体測定や抗原測定、遺伝子測定を行うに際しては、ウイルス抗原、および遺伝子の多様性が考慮される必要があるものと考えられ、そのためにはできるだけ多くの種類のウイルス遺伝子とその発現産物を得ておく必要があると考えられる。

【0009】本発明の目的は、非A非B型肝炎ウイルスの構造および非構造領域の抗原をコードする新規な核酸断片を提供することである。

【0010】本発明の別の目的は、該核酸断片を含む発現ベクターを提供することである。

【0011】本発明のさらに別の目的は、該発現ベクターを含む宿主細胞を提供することである。

【0012】本発明の他の目的は、該宿主細胞を培養し、該核酸断片を発現させて得られる該抗原（ポリ）ペプチドの製造法を提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記目的を達成する為に、特定の非A非B型肝炎患者血漿中より既報のものとは異なる非A非B型肝炎ウイルス遺伝子を

クローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0014】本発明を完成するに当たっては、非A非B型肝炎患者血漿よりRNAを抽出し、逆転写酵素を作用させcDNAを得、2種類のプライマーを用いてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応；Science 230:1350(1985)）を行うことによりDNAを増幅する。増幅に際して利用するプライマーについては、既報の配列（J. Virol. 65, 1105(1991)；Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9524(1990)；Virus Gene 5:3 243(1991)；J. General Virol. 72:2697(1991)）をもとに設定した。増幅したDNAを大腸菌内で複製できるクローニングベクターを用いてクローニングし、Sangerのジデオキシ鎖終止法（Science, 214, 1205(1981)）を用いてヌクレオチド配列の決定を行った。

【0015】上記方法によって14種類のクローンを得、各々C14-1、C14-2、C14-3、C4-1、C4-2、C14-4、C14-5、C14-6、C14-7、C14-8、C14-9、C14-10、C14-11及びC14-12と命名した。尚、C14及びC4は、それぞれ単独の患者より得られた一連のクローンである。得られた14種類のクローンのうちC14-7クローンを除く13種類のクローンは大腸菌JM109株に移入した後、形質転換体としてそれぞれ微工研菌寄第13029号、同第13030号、同第13031号、同第13027号、同第13028号、同第13032号、及び同第13033号（以上、平成4年6月24日付け寄託）、並びに、FERM P-13592、同P-13593、同P-13594、同P-13595、同P-13596、及び同P-13597（以上、平成5年4月9日付け寄託）として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0016】得られた14種類のクローンは、図1及び図2に示す如く、既報の非A非B型肝炎ウイルス遺伝子のヌクレオチド配列との相同性比較により各々C14-1は5'非翻訳領域およびコア領域の一部分、C14-3、C4-1、C4-2及びC14-5はNS3領域、C14-2はE2/NS1領域、C14-4はコア/E1領域、C14-6はコア/E1/E2/NS1領域、C14-7はNS2/NS3領域、C14-8はNS4/NS3領域、C14-9はNS4/NS5領域、C14-10、C14-11及びC14-12はNS5領域と推定された。決定したクローンC14-1、C14-2、C14-3、C4-1、C4-2、C14-4、C14-5、C14-6、C14-7、C14-8、C14-9、C14-10、C14-11及びC14-12のヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列をそれぞれ後記配列表中配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13及び14に示した。

【0017】得られた各クローンの特徴を以下に示す。

【0018】(1)クローン C14-1
701ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号320~700(127アミノ酸)であり、5'非翻訳領域およびコア抗原領域の一部に相当する。

【0019】(2)クローン C14-2
910ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号1~909(303アミノ酸)であり、E2/NS1領域の一部に相当する。

【0020】(3)クローン C14-3
852ヌクレオチドからなり、翻訳領域は1~852(284アミノ酸)であり、NS2およびNS3抗原領域の一部に相当する。

【0021】(4)クローン C4-1
819ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号1~819(273アミノ酸)であり、NS2およびNS3抗原領域の一部に相当する。

【0022】(5)クローン C4-2
992ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号3~992(330アミノ酸)であり、NS3抗原領域の一部に相当する。

【0023】(6)クローン C14-4
596ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号1~594(198アミノ酸)であり、コア抗原領域、およびE1抗原領域の一部に相当する。

【0024】(7)クローン C14-5
1143ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2~1141(380アミノ酸)であり、NS3抗原領域の一部に相当する。

【0025】(8)クローン C14-6
1134ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号1~1134(378アミノ酸)であり、E1およびコア、E2/NS1領域の一部に相当する。

【0026】(9)クローン C14-7
1664ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2~1663(554アミノ酸)であり、E2/NS1およびNS2、NS3領域の一部に相当する。

【0027】(10)クローン C14-8
667ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2~667(222アミノ酸)であり、NS4及びNS3領域の一部に相当する。

【0028】(11)クローン C14-9
1120ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2~1120(373アミノ酸)であり、NS4およびNS5領域の一部に相当する。

【0029】(12)クローン C14-10
1174ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2~1174(391アミノ酸)であり、NS5領域の一部に相当する。

【0030】(13)クローン C14-11
1057ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチ

ド番号2～1057(352アミノ酸)であり、NS5領域の一部に相当する。

【0031】(14) クローン C14-12

648ヌクレオチドからなり、翻訳領域はヌクレオチド番号2～646(215アミノ酸)であり、NS5領域の一部に相当する。

【0032】なお、非A非B型肝炎ウイルスゲノムのコード領域はコア/エンベロープの構造領域と非構造領域(NS)とから構成されており、コード領域の5'端からCORE、E1、E2/NS1、NS2、NS3、NS4、NS5の順に配列されている(J. Virology (1991), 65:1105～1113)。

【0033】更にクローンC14-1、C14-2、C14-3、C4-1、C4-2、C14-4、C14-

5、C14-6、C14-7、C14-8、C14-9、C14-10、C14-11及びC14-12のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列をそれぞれ既報のHCV1 (Proc. Natl. Acad. Sci. (1991), 88:2451～2455)、HCVBK (J. Virology (1991), 65:1105～1113)、HCV-J1 (Proc. Natl. Acad. Sci. (1990), 87:9524～9528)、HC-J6 (J. General Virology (1991), 72:2697～2704)及びHC-J8 (Virology (1992), 188:331～341)の配列と同一性を比較した結果を下表1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13及び14に示した。

【0034】

【表1】

HCV遺伝子	表 1 相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-1/		
HCV1	88.3	89.0
HCVBK	88.7	90.6
HCV-J1	88.3	90.6
HC-J6	96.3	95.3
HC-J8	91.0	92.1

【0035】

【表2】

HCV遺伝子	表 2 相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-2/		
HCV1	67.5	72.9
HCVBK	69.8	75.2
HCV-J1	69.5	72.9
HC-J6	90.7	90.8
HC-J8	74.4	86.5

【0036】

【表3】

HCV遺伝子	表 3 相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-3/		
HCV1	68.2	75.5
HCVBK	68.4	75.5
HCV-J1	68.5	76.2
HC-J6	91.8	97.5
HC-J8	75.7	88.7

【0037】

【表4】

HCV遺伝子	表 4 相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C4-1/		
HCV1	77.2	91.1
HCVBK	88.8	94.1

HCV-J1	90.4	93.8
HC-J6	67.8	73.6
HC-J8	66.6	74.6

【0038】

【表5】

表 5

相同性 (%)

HCV遺伝子	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C4-2/		
HCV1	80.0	93.6
HCVBK	90.5	96.1
HCV-J1	91.3	94.2
HC-J6	71.8	86.1
HC-J8	72.2	85.2

【0039】

【表6】

表 6

相同性 (%)

HCV遺伝子	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-4/		
HCV1	65.8	70.2
HCVBK	66.3	65.7
HCV-J1	64.9	66.2
HC-J6	90.8	92.4
HC-J8	72.8	74.7

【0040】

【表7】

表 7

相同性 (%)

HCV遺伝子	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-5/		
HCV1	73.6	86.3
HCVBK	72.0	86.1
HCV-J1	71.5	85.3
HC-J6	91.5	95.3
HC-J8	78.7	92.9

【0041】

【表8】

表 8

相同性 (%)

HCV遺伝子	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-6/		
HCV1	65.2	67.2
HCVBK	65.5	62.8
HCV-J1	63.5	62.0
HC-J6	87.8	86.2
HC-J8	70.8	74.1

【0042】

【表9】

表 9

相同性 (%)

HCV遺伝子	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-7/		
HCV1	62.7	66.1
HCVBK	63.1	66.6

【0043】

HCV-J1	62.8	67.0
HC-J6	90.6	95.1
HC-J8	72.5	79.1

【表10】

HCV遺伝子	表 10	
	相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-8/		
HCV1	68.0	73.0
HCVBK	66.0	69.8
HCV-J1	65.5	70.3
HC-J6	90.9	96.8
HC-J8	77.3	90.5

【0044】

【表11】

HCV遺伝子	表 11	
	相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-9/		
HCV1	66.7	68.8
HCVBK	67.7	72.1
HCV-J1	67.0	71.8
HC-J6	90.1	95.7
HC-J8	77.5	87.4

【0045】

【表12】

HCV遺伝子	表 12	
	相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-10/		
HCV1	55.8	58.8
HCVBK	54.6	58.8
HCV-J1	50.6	60.3
HC-J6	88.9	90.8
HC-J8	70.0	72.8

【0046】

【表13】

HCV遺伝子	表 13	
	相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-11/		
HCV1	69.8	76.4
HCVBK	69.7	76.4
HCV-J1	70.8	78.3
HC-J6	93.6	96.0
HC-J8	80.0	87.5

【0047】

【表14】

HCV遺伝子	表 14	
	相同性 (%)	
	全ヌクレオチド配列	全アミノ酸配列
C14-12/		
HCV1	67.6	72.6
HCVBK	67.2	73.0

HCV-J 1	68. 5	73. 5
HC-J 6	94. 1	95. 3
HC-J 8	83. 3	87. 4

これらの表より、クローンC14-1は公表された非A非B型肝炎ウイルス遺伝子との間で、ヌクレオチド配列で3. 7~11. 7%、アミノ酸配列で4. 7~11. 0%の相違を示した。またクローンC14-2ではそれぞれ9. 3~32. 5%、9. 2~27. 1%；クローンC14-3ではそれぞれ8. 2~31. 8%、2. 5~24. 5%；クローンC4-1ではそれぞれ9. 6~33. 4%、5. 9~26. 4%；クローンC4-2ではそれぞれ8. 7~28. 2%、3. 9~14. 8%；クローンC14-4ではそれぞれ9. 2~35. 1%、7. 6~34. 3%；クローンC14-5ではそれぞれ8. 5~28. 5%、4. 7~13. 9%；クローンC14-6ではそれぞれ12. 2~36. 5%、13. 8~37. 2%；クローンC14-7ではそれぞれ9. 4~37. 3%、4. 9~33. 4%；クローンC14-8ではそれぞれ9. 1~34. 5%、3. 2~30. 2%；クローンC14-9ではそれぞれ9. 9~33. 3%、4. 3~31. 2%；クローンC14-10ではそれぞれ11. 1~49. 4%、9. 2~41. 2%；クローンC14-11ではそれぞれ6. 4~30. 3%、4. 0~23. 6%；クローンC14-12ではそれぞれ5. 9~32. 8%、4. 7~27. 4%の相違が認められた。このことは、C4、C14株は現在までに公表されているHCV株とは別の株であることを示している。

【0048】従って、本発明は、非A非B型肝炎患者血漿より遺伝子工学的手法により得られた非A非B型肝炎ウイルスの構造及び非構造領域の抗原をコードするヌクレオチド配列を含む新規な核酸断片を提供する。

【0049】本発明の実施態様により、該核酸断片は、後記配列表中配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13および14に示されるアミノ酸配列の全部または一部で表わされる非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするヌクレオチド配列を含む。また、該ヌクレオチド配列には、遺伝暗号の縮重に基づく全ての配列が包含される。このようなヌクレオチド配列の具体例は、配列番号1に示されるヌクレオチド番号1から700までの配列の全部または一部、配列番号2に示されるヌクレオチド番号1から909までの配列の全部または一部、配列番号3に示されるヌクレオチド番号1から852までの配列の全部または一部、配列番号4に示されるヌクレオチド番号1から819までの配列の全部または一部、配列番号5に示されるヌクレオチド番号3から992までの配列の全部または一部、配列番号6に示されるヌクレオチド番号1から594までの配列の全部または一部、配列番号7に示されるヌクレオチド番号2から1141までの配列の全部または一

部、配列番号8に示されるヌクレオチド番号1から1134までの配列の全部または一部、配列番号9に示されるヌクレオチド番号2から1663までの配列の全部または一部、配列番号10に示されるヌクレオチド番号2から667までの配列の全部または一部、配列番号11に示されるヌクレオチド番号2から1120までの配列の全部または一部、配列番号12に示されるヌクレオチド番号2から1174までの配列の全部または一部、配列番号13に示されるヌクレオチド番号2から1057までの配列の全部または一部、配列番号14に示されるヌクレオチド番号2から646までの配列の全部または一部である。

【0050】本発明はまた、上記核酸配列が、プロモーターの下流に存在するベクター内のクローニング部位に導入された発現ベクターを提供する。さらに、本発明は該発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0051】ベクターとしては、プラスミド、ファージ等の慣用のベクターの他に、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス等）が使用される。DNA発現により得られる組換え（ポリ）ペプチドが糖鎖構造をもつようにするか否かによって、使用し得るプロモーターおよび宿主の種類が決まる。すなわち、組換え（ポリ）ペプチドが糖鎖構造を含まないようにする場合には、宿主として例えば大腸菌、枯草菌、放線菌等の原核生物を用いることができ、また、プロモーターとして例えばトリプトファン合成酵素オペロン（trp）、ラクトースオペロン（lac）、ラムダファージPL、PR等を用いることができる。この場合には、一般に他のペプチドとの融合体として得られるだろう。一方、組換え（ポリ）ペプチドが糖鎖構造を含むようにする場合には、宿主として例えば酵母、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等の真核生物が挙げられ、またプロモーターとして酵母等に慣用のプロモーター例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ、エノラーゼ等の解糖系酵素に対するプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼに対するプロモーター、哺乳動物細胞で使用され得るウイルスプロモーター例えばポリオーマウイルス、アデノウイルス、サルウイルスSV40、ワクシニアウイルス、サイトメガロウイルス等由来のプロモーターが挙げられる。

【0052】ベクターはさらに、形質転換された細胞の表現型選択を可能にするマーカー配列（例えばアンピシリン、テトラサイクリン耐性遺伝子等）、複製開始点、ターミネーター、リボソーム結合部位等を適宜含み得る。

【0053】本発明はさらに、組換え非A非B型肝炎ウイルス抗原（ポリ）ペプチドの製造方法を提供する。この方法は、具体的には、本発明の上述の核酸断片を適当

な宿主細胞内で発現させ得る複製可能な発現ベクターを構築する工程、前記発現ベクターを宿主細胞内に導入して形質転換体を得る工程、前記核酸断片を発現させ得る条件下で前記形質転換体を培養して前記組換え(ポリ)ペプチドを発現させる工程、および前記組換え(ポリ)ペプチドを回収する工程を包含する。

【0054】形質転換体の培養条件は、使用する宿主細胞に依存して決定され、増殖可能な培地、培養温度、培養時間等が適宜選択される。また、培養物からの組換え(ポリ)ペプチドの精製は、慣用の技術例えば細胞の超音波破碎、可溶化抽出、硫酸分画、各種クロマトグラフィー等により行うことができる。

【0055】本明細書中「組換え(ポリ)ペプチド」とは、発現ベクターに組み込んだ非A非B型肝炎ウイルス抗原をコードするDNAを発現させて得られる(ポリ)ペプチド自体または他の(ポリ)ペプチドとの融合(ポリ)ペプチドを意味する。

【0056】本発明には、上記方法で得られた組換え(ポリ)ペプチドも包含される。このような(ポリ)ペプチドは、慣用のペプチド合成技術を用いることによって化学合成することも可能であり、これは当業者には自明のことである。

【0057】本発明によって得られた組換えポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、ウエスタンブロット法により正常人血清及び非A非B型肝炎患者血清と反応させたところ、図4及び図5に示すように本組換えポリペプチドは非A非B型肝炎患者血清とのみ反応した。従って本組換えポリペプチドは非A非B型肝炎ウイルスに特異的な抗原であり、非A非B型肝炎の診断及び非A非B型肝炎ウイルスの検出に使用可能である。

【0058】

【実施例】以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0059】実施例1

RT-PCRによるHCV(#S14)遺伝子の検出
慢性期非A非B型肝炎患者の血漿よりHCV遺伝子をクローニングする方法として少量の血漿でクローニングが可能なRT(リバーシ・トランスクリプターゼ)-PCR法を利用してHCV遺伝子のクローニングを行った。

【0060】まず、単一の慢性期の非A非B型肝炎患者血漿(#S14)100 μ lに6MのGTC液(6Mグアニジンチオシアネート、37.5mMクエン酸ナトリウム、0.75%ザルコシル、0.2Mメルカプトエタノール)200 μ lと酵母のt-RNA(10mg/ml)1 μ lを加え攪拌する。更に3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)20 μ l、TE飽和フェノール(pH 7.5~8.0)30 μ l、クロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)70 μ lを加え素早く混合し、10秒間攪拌した後、氷中に15分間静置する。遠心機で150

00 rpm、20分間4 $^{\circ}$ Cで遠心する。水層を採り、等量のイソプロピルアルコールと混合し-20 $^{\circ}$ Cに1時間以上置く。これを15000 rpm、20分間4 $^{\circ}$ Cで遠心し、沈殿させる。沈殿物を4MのGTC(6M GTCを滅菌水で希釈したもの)100 μ lに溶解し、等量のイソプロピルアルコールと混合し、-20 $^{\circ}$ Cに1時間以上静置する。15000 rpm、20分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心し沈殿物を得る。70%エタノール1mlで洗浄後、室温で風乾し、10 μ lの滅菌水に溶解しRNAとして使用した。

【0061】cDNA合成はRNA 10 μ lをシリコン処理チューブ(0.5ml)に分注した後、70 $^{\circ}$ C、3分間加熱し、氷上で急冷する。次にRNAseインヒビター(宝酒造)1 μ l(50単位/ μ l)、dNTP(各20mM)1 μ l、100mM DTT、5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl(pH 8.5)、375mM KCl、15mM MgCl₂)4 μ l、ランダムオリゴヘキサマープライマー(100pmol/ μ l)1 μ l、逆転写酵素(BRL)(200単位/ μ l)1 μ lを加え、滅菌水で計20 μ lに合わせる。42 $^{\circ}$ Cで2時間反応後、94 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し酵素を失活させた。このcDNAを用いてPCRを行った。PCRは検出DNAの増幅感度と特異性を挙げる為に2ステップ法を用いた。即ち、まず2種のプライマーで1回目のPCRをかける(1st step PCR)。次にそのPCR産物のDNA配列の内側に存在する2種のプライマーを用いて2回目のPCRをかける(2nd step PCR)方法である。

【0062】C14-1領域、C14-2領域、C14-3領域、C14-4領域、C14-5領域、C14-6領域、C14-7領域、C14-8領域、C14-9領域、C14-10領域、C14-11領域、C14-12領域の12の領域についてプライマーを合成し、2ステップ法に使用した。以下に使用したPCRプライマーを記述する。尚、それぞれの領域は既報の配列(J. Virol. 65, 1105-1113(1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9524-9528 (1990); Virus Genes 5:3, 243-259 (1991); J. General Virol. 72, 2697-2704 (1991))を参考に設定した。又それぞれの増幅領域と既報の配列(HC-J6)との位置関係を図1及び図2に示す。

【0063】C14-1領域については、1st PCRに際してはプライマー14-1: 5'-CGATTGGGGGCGA-3'及び14-2: 5'-TTGCAA AATTAAACCCCGTCTCCTCCAG-3'を使用し、2nd PCRにはプライマー14-1と14-3: 5'-CATGAGGTCGGCGAAGCCGC-3'を用いた。

【0064】C14-2領域については、1st PCRはプライマー14-8: 5'-CACCAATGGCA GTTGGCACATCAAC-3'と14-9: 5'-GGACTACCCGACCCTTGATGTACC

A-3' を使用し、2nd PCRはプライマー14-10: 5'-CTGTTCTACACCCACAGCTTCAAC-3' と14-11: 5'-GCGTGCAA GACGACCAACTTCTCTA-3' を用いた。

【0065】C14-3領域については、1st PCRはプライマー14-12: 5'-GAGCGGAGACAGCTGCTTGCGGGGA-3' と14-13: 5'-ATAGGTGGAGTACGTGATGGG-3' を使用し、2nd PCRはプライマー14-14: 5'-TTCCCGTGTCCGCCCGA-3' と14-13を用いた。

【0066】C14-4領域については、1st PCRはプライマー14-4: 5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTC-3' と14-5: 5'-GCCGTTGTAGGTGACCAAGTTTC-3' を使用し、2nd PCRはプライマー14-6: 5'-TGGGT

AAGGTCATCGATACC-3' と14-5を用いた。

【0067】C14-5領域については、1st PCRはプライマー14-15: 5'-CTGGTAGTGGAAAGAGCACCAAAGT-3' と14-16: 5'-TGCATGCACGTGGCGATGTA-3' を使用し、2nd PCRはプライマー14-17: 5'-TCGCGTATGCCGCTCAGGGGTA CAA-3' と14-18: 5'-GTCAGGGTAACCTCGTTGGTA-3' を用いた。

【0068】さらに、C14-6、C14-7、C14-8、C14-9、C14-10、C14-11及びC14-12領域については、下記に示すPCRプライマーを用いた。

【0069】

【表15】

C14-6

1st: 5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTC-3' (14-4)
5'-CTATCGGTGTAACCACTAC-3' (14-19)
2nd: 5'-TGGGTAAGGTCATCGATACC-3' (14-6)
5'-TGAAACAGTACACTGGGCCACAC-3' (14-20)

C14-7

1st: 5'-ACCTGCCCGCCTTGTCGACTGGT-3' (14-21)
5'-ATAGGTGGAGTACGTGATGGG-3' (14-13)
2nd: 5'-AAACATCGTGGACGTGCAAT-3' (14-22)
5'-GAATTCTGATGCCATGTGCCCTGGACA-3' (14-23)

C14-8

1st: 5'-GGATACACCGGTGACTTTGA-3' (14-24)
5'-CCCCAAATGTTGAGAAGGATA-3' (14-25)
2nd: 5'-GATGCCCACTTCTCTCCA-3' (14-26)
5'-GTGCTAGTTGACAACGGACTGGT-3' (14-27)

C14-9

1st: 5'-AACACATGTGGAACCTCATCA-3' (14-28)
5'-ATATGGGATGGGTCTGTTAGCATGGA-3' (14-29)
2nd: 5'-ACCTCGCAGGACTATCAACTGCC-3' (14-30)
5'-GATCGGAAGGGAGCTGAGACCCGAC-3' (14-31)

C14-10

1st: 5'-TAACGAGTGACAACCTTAA-3' (14-32)
5'-AAGTGCGGACCTCCTTAGCCCC-3' (14-33)
2nd: 5'-ACGGAGTGCAGATCCATAGGTTGCCCC-3' (14-34)
5'-TTGCAGAGTGGGTGGAGTTAACTGGCA-3' (14-35)

C14-11

1st: 5'-GTCGTCTGCTGCTCAATGTC-3' (14-36)
5'-GTGTCTAACTGTTCCAGGCAGCC-3' (14-37)
2nd: 5'-ATCAATCCGTTGAGCAACTC-3' (14-38)
5'-TGGTAGGGTCTCTGGTCAGGTAGTN-3' (14-39)

C14-12

1st: 5'-CTAGCATGGGGAACACCATCACATG-3' (14-40)
5'-TGTCTTTCATCCTCATCCGN-3' (14-41)
2nd: 5'-GAGCCTTCACGGAGGCTATGAC-3' (14-42)

5' -TCGGGCACGGACACGCTGTGATAN -3' (14-43)

(NはG, A, T, Cのミックスを示す)。

【0070】PCRの条件は、0.5mlチューブ中に上記cDNA合成反応液を20μlと10×PCR緩衝液(100mM Tris-HCl (pH8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1% gelatine) 8μl、1st stepプライマー2種(各75pmole)、2mM dNTP 8μlを加え、滅菌水で100μlにする。94℃で10分間加熱し、Ampli Taq (Perkin-Elmer-Cetus) 1μl(5単位)を加え攪拌後、ミネラルオイルを重層し軽く遠心する。PCR反応は、変性94℃1分間、アニーリング55℃1分間、伸長72℃2分間の条件で30サイクル行った。次に新しい0.5mlチューブに1st PCR反応終了液10μl、10×PCR緩衝液9μlを加え、2nd stepプライマー2種(各75pmole)、2mM dNTP 9μl、滅菌水で100μlとする。94℃で10分間加熱し、Ampli Taq 1μl(5単位)を加え攪拌後、ミネラルオイルを重層し軽く遠心し、先の条件で2nd PCRを行う。反応後、反応液10μlをアガロースゲル電気泳動し、特異的に増幅されたDNA断片を検出した。

【0071】PCR産物(HCV #S14のDNA断片)のクローニングと塩基配列の決定

HCV遺伝子は複製時に変異が導入され易い可能性が考えられた。そこでクローニング時に発生する人為的な変異をできるだけ少なくする為にベクターとしてpBR322 (Sutcliffe, J. G., Cold Spring Harbor Symposium, 43, 77-90(1979))を改変したベクター(pBM)を用いた。pBMはpBR322の制限酵素EcoRVサイトからBam Iサイトの間の配列を制限酵素で欠失させ、EcoR IサイトとHind IIIサイト間にpUC119 (Vieria, J., Messing, J., Methods in Enzymology, 153, 3-11 (1987))のマルチクローニングサイトのEcoR IサイトからHind IIIサイトまでを組み込んだ(ΔpBR MCS)。次にpBR322のVsp IサイトからSca Iサイトの間の配列をpUC119のVsp IサイトからSca Iサイト間の配列に置き換え、この間のPst Iサイトを欠失させ全長3122bpのベクターを作製した(図3)。

【0072】HCVのDNAが検出されたPCR反応液は全量を等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)と混和し、遠心後、その水層を0.5mlチューブに移し、10分の1量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、2倍量のエタノールを加え、エタノール沈殿した。沈殿物は10mMトリス塩酸-1mM EDTA (pH7.4) (TE) 300μlに溶解し、ウルトラフリーC3TK (日本ミリポアリミテッド)にて遠心濾過し、残存プライマー除去、および脱塩を行った。処理液は10×T4 DNAポリメラーゼ緩衝液(30mMト

リス酢酸、0.66M酢酸カリウム、0.1M酢酸マグネシウム、5mM DTT、1mg/ml BSA) 2μl、2mM dNTP 1μl、T4 DNAポリメラーゼ4単位(宝酒造)を加え滅菌水にて20μlとし、12℃、15分間反応した。反応後、等量のフェノール/クロロホルム(25:24)、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)でそれぞれ1回ずつ抽出を行い、水層をエタノール沈殿した。沈殿物は、75%エタノールで洗浄後、風乾し、10×イミダゾール緩衝液(0.5Mイミダゾール塩酸(pH6.4)、0.18M塩化マグネシウム、50mM DTT) 4μl、24%ポリエチレングリコール6000 10μl、10mM ATP 0.5μl、T4 DNAキナーゼ(宝酒造) 20単位を加え滅菌水で40μlとし、37℃、1時間反応して5'末端をリン酸化した。クロロホルム/イソアミルアルコール処理によって酵素を失活させ、水層をエタノール沈殿後、75%エタノールで洗浄した。沈殿物は低融点アガロースゲル電気泳動によりDNAを単離し、TE飽和フェノールで2回抽出を行い、DNA断片をエタノール沈殿し75%エタノールで洗浄後、滅菌水10μlに溶解しその1μlをアガロースゲル電気泳動し、DNA断片量を決定した。

【0073】ここで得られたDNA断片はあらかじめ制限酵素Sma Iにて切断し、アルカリフォスファターゼ処理によりその5'末端の脱リン酸化を行ったpBMベクターとの連結反応を行う。

【0074】pBM(20μl)は制限酵素反応液50μl(10mM Tris-HCl (pH8.0)、7mM MgCl₂、20mM KCl、Sma I(宝酒造) 80単位)中で30℃、90分反応し、68℃、15分加熱後エタノール沈殿する。沈殿物を75%エタノールで洗浄後、風乾し、10×アルカリフォスファターゼ緩衝液(100mM Tris-HCl (pH8.3)、1mM ZnCl₂、10mM MgCl₂) 5μl、アルカリフォスファターゼ(牛小腸由来; 宝酒造) 1単位に滅菌水を加え50μlとし、37℃、1時間反応させることにより脱リン酸化した。500mM EDTA (pH7.5) 0.5μl、10%SDS 2.5μlを加え、更にプロテアーゼKを終濃度50μg/mlとなるように加え、56℃、30分反応し、酵素を失活させた後、低融点アガロースゲル電気泳動によりベクターを単離し、TE飽和フェノールで2回抽出を行い、エタノール沈殿して、75%エタノールで洗浄、風乾後、滅菌水50μlに溶解した。その1μlをアガロースゲル電気泳動し、ベクター量を決定し、終濃度0.1μg/mlのSma Iクローニングベクターとした。

【0075】リン酸化したDNA断片はSma Iクローニングベクター25ngに対してモル比で15倍から2

0倍量加え、10×ライゲーション緩衝液(0.66M Tris-HCl (pH7.6)、50mM MgCl₂、50mM DTT) 2μl、10mMヘキサミン塩化コバルト2μl、BSA(1mg/ml) 2μl、10mMATP 1μl、T4DNAリガーゼ(宝酒造) 350単位を加え、滅菌水で20μlとし、16℃で一夜連結反応を行った。この反応液にtRNA(10mg/ml) 0.5μlを加え、エタノール沈殿後、75%エタノールで洗浄し、その沈殿物を10μlの滅菌水に溶解し、その半量を用いて大腸菌JM109株、又はSCS1株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株(コンピテントセル)は既報(J. Mol. Biol., 166, 577 (1983))に基づいて調製したものを用いた。

【0076】形質転換菌はLB-Ampプレート(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、アンピシリン50μg/ml)上で一夜培養した後、プレート上に出現したコロニーをそれぞれ3ml LB-Ampの入った15mlチューブで培養し、1.5mlの培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレパレーション(Maniatisら, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1982)を行い、15μlのDNA液を調製した。内、2~3μlを制限酵素EcoRIとHindIII各4単位、反応緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl) 10μl中で37℃、1時間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、挿入されたDNA断片の大きさを確認した。

【0077】各12の領域はC14-1が約710bp、C14-2領域が約950bp、C14-3領域が約850bp、C14-4領域が約600bp、C14-5領域が約1200bp、C14-6領域が約1134bp、C14-7領域が約1664bp、C14-8領域が約667bp、C14-9領域が約1120bp、C14-10領域が約1174bp、C14-11領域が約1057bp、C14-12領域が約648bpのDNA断片がそれぞれ確認された。

【0078】得られた12種類のDNAは更にSanger等のジデオキシターミネーション法(Science, 214, 1205-1210 (1981))を用い、その塩基配列を決定した。又、このDNA塩基配列決定に使用したそれぞれの領域クローンをC14-1、C14-2、C14-3、C14-4、C14-5、C14-6、C14-7、C14-8、C14-9、C14-10、C14-11、C14-12と命名した。又、決定した遺伝子の塩基配列及びそれより推定されるアミノ酸配列をC14-1は配列番号1として、C14-2は配列番号2、C14-3は配列番号3、C14-4は配列番号6、C14-5は配列番号7、C14-6は配列番号8、C14-7は配列番号9、C14-8は配列番号10、C14-9は

配列番号11、C14-10は配列番号12、C14-11は配列番号13、C14-12は配列番号14として示した。上記プラスミドは形質転換体としてC14-1は微工研菌寄第13029号、C14-2は同第13030号、C14-3は同第13031号、C14-4は同第13032号、C14-5は同第13033号として平成4年6月24日付けで、また、C14-6はFERM P-13592、C14-8は同P-13593、C14-9は同P-13594、C14-10は同P-13595、C14-11は同P-13596、C14-12は同P-13597として平成5年4月9日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0079】実施例2

RT-PCRによるHCV(#4)遺伝子の検出

上記実施例1で示したと同様の方法にて、実施例1とは異なる単一の慢性非A非B型肝炎患者血漿からのHCV(#4)遺伝子のRT-PCRを行い、C4-1及びC4-2領域の増幅DNA断片を検出した。

【0080】用いたプライマーを以下に示した。

【0081】C4-1領域については、1st PCRはプライマー4-1: 5'-ATGGAGACTAAAC TCATCAC-3' と4-2: 5'-ACTGTGC CGATGCCCAAGAT-3' を使用し、2nd PCRはプライマー4-3: 5'-TACTTCTAGG ACCGGCCGAT-3' と14-13: 5'-AT AGGTGGAGTACGTGATGGG-3' を用いた。

【0082】C4-2領域については、1st PCRはプライマー4-4: 5'-TGGAGCGTATATG TCCAAGG-3' と4-5: 5'-GACATGC ATGCCATGATGTA-3' を使用し、2nd PCRはプライマー4-4と4-6: 5'-CACATT TGGTCCCACGATGG-3' を用いた。

【0083】PCR産物のクローニングと塩基配列の決定

クローニングに際しては、ベクターとしてpUC119を用い、そのSmaIサイトと、上記プライマーを用いてPCRにより増幅した遺伝子断片を実施例1で示した方法によってクローニングし、塩基配列を決定した。

又、このDNA塩基配列決定に使用したそれぞれの領域クローンをC4-1、C4-2と命名した。決定した遺伝子の塩基配列及びそれより推定されるアミノ酸配列をC4-1は配列番号4として、C4-2は配列番号5として示した。上記プラスミドは形質転換体としてC4-1は微工研菌寄第13027号、C4-2は同第13028号として平成4年6月24日付けで寄託されている。

【0084】実施例3

大腸菌を用いたHCV(#S14)由来遺伝子の発現(その1)

a) 発現プラスミドの構築

上記実施例1において得られたクローンC14-1のDNAを利用してプライマーB1: 5'-CATGAGCATAAATCCTAAACCTCAAAG-3'とB2: 5'-ATCTGCAGTTATAGGGTGTCGATGACCTTACCC-3'を用いて実施例1のPCR条件でPCRを行い、約380bpのDNA断片を増幅した。PCR反応液は全量を実施例1の方法でクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)で処理し、その水層をエタノール沈殿し、TE300μlに溶解後、遠心濾過し、残存プライマー除去及び脱塩を行い、T4DNAポリメラーゼ処理後、T4DNAキナーゼ処理によって5'末端を磷酸化した。得られたDNA断片は反応緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl)中でPst I 20単位を加えて消化し、低融点アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルよりDNAを単離し、TE飽和フェノールで2回抽出後、エタノール沈殿し、滅菌水10μlに溶解し、約380bpのDNA断片として精製した。ここで得られたDNA断片は発現ベクターpKK223-3

(ファルマシア)をあらかじめ上述の条件にて制限酵素Pst Iで切断し、更に実施例1に示した条件にて制限酵素Sma Iで切断し、アルカリフォスファターゼ処理によりその5'末端の脱磷酸化を行ったそのベクター25ngと実施例1の条件でT4DNAリガーゼにより連結反応を行い、大腸菌JM105株を用い、形質転換した。

【0085】形質転換菌はLB-Ampプレート(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天、50μg/mlアンピシリン)上で一夜培養後、プレート上に出現したコロニーをそれぞれ3mlのLB-Ampの入った15mlチューブで培養し、その1.5mlを遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレパレーション(Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)を行い、15μlのDNA液を調製した。内2-3μlを制限酵素EcoRIとPst I各4単位、反応緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl)10μl中で37℃、1時間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、約380bpのDNA断片が挿入されているクローンを得た。

【0086】b) ウエスタンブロット法による発現の確認及び非A非B型肝炎患者血清との反応

上記大腸菌クローンを3mlのLB-Amp培地で37℃、3時間前培養した後、その50μlを新しいLB-Amp培地5mlに接種し、37℃、2時間培養した。培養液に終濃度2mMになるようにIPTG(和光純薬)を加え、更に37℃、3時間培養した。培養液1.5mlを13000rpm、2分間遠心し、集菌後、TE1mlで

菌を洗浄し、13000rpm、2分間遠心し、再び集菌した。集菌したペレットに50μlの滅菌水および50μlの2×サンプル緩衝液(100mM Tris-HCl (pH 6.8)、20%グリセロール、10%SDS、5% 2-メルカプトエタノール、0.2%ブロムフェノールブルー)を加え懸濁混和し、懸濁液を100℃、5分間煮沸後氷冷下で超音波処理し、-70℃で凍結融解を2回繰り返してサンプルとした。

【0087】上記サンプル30μlをMINI PROTEAN II Dual Slab Cell (Biorad)を用いてLaemmliの方法(Nature, 227, 680(1970))に準じて15mA、1.5時間SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルを取り出し、PVDFメンブレン(ミリポア)を密着させMINI TRANS BLOT Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)を用いて250mA、1.75時間転写した。転写後、メンブレンを5%スキムミルク、2%BSAを含む緩衝液I'(10mM Na-phosphate (pH 7.0)、1%BSA、0.15M NaCl、2.5mM EDTA)に浸漬し、室温で2時間ブロッキングした。5%スキムミルク、2%BSAを含む緩衝液I'で40倍希釈した血清検体にブロッキングしたメンブレンを入れ、室温で4時間反応させた。反応後、メンブレンを緩衝液II(10mM Na-phosphate (pH 7.0)、0.15M NaCl、0.05%Tween 20)で3回洗浄後、2%スキムミルクを含む緩衝液I'で100μl/mlに希釈した抗人IgG-POD標識抗体液(ヤギ抗体)にいれ、室温で30分間反応させた。反応後、メンブレンを取り出し、緩衝液IIで5回洗浄した。洗浄したメンブレンを発色液(20mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5M NaCl、0.05%4-クロロ1ナフトール、0.018%H₂O₂、16.7%メタノール)に浸漬し、室温で15分間反応させた。

【0088】結果を図4に示した。図4においては、非A非B型肝炎患者血清5例(No. 1~No. 5)と健康人血清5例(No. 6~No. 10)についてウエスタンブロットを行った結果を示したが、非A非B型肝炎患者血清でのみ、全てに強い陽性反応が検出され、発現した抗原が、非A非B型肝炎患者の診断及び非A非B型肝炎ウイルスキャリアの検出に有用であることが示された。

【0089】実施例4

大腸菌を用いたHCV(#S14)由来遺伝子の発現(その2)

a) 発現プラスミドの構築

実施例1において得られたクローンC14-3とC14-5のDNAを緩衝液(Takara Universal buffer H)中でそれぞれ制限酵素EcoRI、Pst I及びEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ

約930bpと約950bpのDNA断片を単離し、TE飽和フェノール及びクロロホルム処理後、エタノール沈殿し、滅菌水25 μ lに溶解することによって精製した。精製した各DNAをそれぞれ上記緩衝液中で制限酵素ScaIで消化し、アガロースゲル電気泳動によりそれぞれ約780bpと920bpのDNAを単離し、TE飽和フェノール及びクロロホルム処理後、エタノール沈殿することによって精製した。精製した2種類のDNA、及び予め上記緩衝液中、制限酵素EcoRIで消化したベクターpBluescriptを混合し、T4DNAリガーゼにより連結反応を行い、大腸菌JM109株を用い、形質転換した。

【0090】形質転換菌はLB-Ampプレート(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天、50 μ g/mlアンピシリン)上で一晚培養後、プレート上に出現したコロニーをそれぞれ3mlのLB-Ampの入った15mlチューブで培養し、その1.5mlを遠心処理により集菌し、プラスミドのミニプレパレーション(Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)を行い、20 μ lのDNA液を調製した。調製したDNA液の4 μ lを緩衝液(Takara Universal Buffer H)中EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動することによって約1700bpのDNA断片が挿入されているクローン(28-14D)を得た。このクローン28-14DのDNAを利用してプライマーF2: 5'-CAGAATTCATGGAAACACTCGACATCGCC-3'とプライマーR: 5'-CACTGCAGTTATGAGACAGCGTCTTGAGGGAC-3'を用いてPCR反応を行った。PCR反応は、上記DNA1 μ lに10 \times PCR緩衝液(100mM Tris-HCl (pH 8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1%geratine) 5 μ l、プライマーF2、R(各240pM)、25mM dNTP 0.2 μ l、Taq polymerase (Boehringer) 0.2 μ l(1単位)を加え、滅菌水で50 μ lとした後攪拌し、ミネラルオイルを重層し、変性94 $^{\circ}$ C 0.5分間、アニーリング55 $^{\circ}$ C 0.5分間、伸長72 $^{\circ}$ C 1分間の条件で44サイクル行った。反応後、反応液の全量をTE飽和フェノール及びクロロホルム処理し、その水層をエタノール沈殿し、滅菌水40 μ lに溶解し、緩衝液(Takara Universal Buffer H) 5 μ l、制限酵素EcoRI 20単位、PstI 20単位を加えて消化した。消化後1.5%アガロースゲル電気泳動により約860bpのDNA断片を単離し、TE飽和フェノール及びクロロホルム処理後エタノール沈殿し、5 μ lの滅菌水に溶解することにより精製DNAを得た。ここで得られたDNA断片はその1 μ lを、発現ベクターpKK223-3(ファルマシア)を予め制限酵素EcoRIとPstIで切断し、上述の条件で精製した物1

μ lと混合し、T4DNAリガーゼにより連結し、大腸菌JM109株を用い、形質転換した。

【0091】形質転換菌は、LB-Ampプレート(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天、50 μ g/mlアンピシリン)上で一晚培養後、プレート上に出現したコロニーをそれぞれ3mlのLB-Ampの入った15mlチューブで培養し、その1.5mlを遠心処理により集菌し、プラスミドのミニプレパレーション(Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)を行い、20 μ lのDNA液を調製した。調製したDNA液の4 μ lを緩衝液(Takara Universal Buffer H)中EcoRI及びPstIで消化し、アガロースゲル電気泳動することによって約860bpのDNA断片が挿入されているクローンを得た。

【0092】b) ウェスタンブロット法による発現の確認及び非A非B型肝炎患者血清との反応
上記大腸菌クローンを3mlのLB-Amp培地で37 $^{\circ}$ C、3時間前培養した後、その50 μ lを新しいLB-Amp培地5mlに接種し、37 $^{\circ}$ C、2時間培養した。培養液に終濃度2mMになるようにIPTG(和光純薬)を加え、更に37 $^{\circ}$ C、3時間培養した。培養液1.5mlを13000rpm、2分間遠心し集菌後、TE1mlで菌を洗浄し、13000rpm、2分間遠心し、再び集菌した。集菌したペレットに50 μ lの滅菌水及び50 μ lの2 \times サンプル緩衝液(100mM Tris-HCl (pH 6.8)、20%グリセロール、10%SDS、5%2-メルカプトエタノール、0.2%ブロムフェノールブルー)を加え懸濁混和し、懸濁液を100 $^{\circ}$ C、5分間煮沸後氷冷下で超音波処理し、-70 $^{\circ}$ Cで凍結融解を2回繰り返してサンプルとした。

【0093】上記サンプルをMINI PROTEAN II Dual Slab Cell (Biorad)を用いてLaemmliの方法(Nature, 227, 680(1970))に準じて15mA、1.5時間SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルを切り出し、PVDFメンブレン(ミリポア)を密着させMINI TRANS BLOT Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)を用いて250mA、1.75時間転写した。転写後、メンブレンを5%スキムミルク、2%BSAを含む緩衝液I'(10mM Na-phosphate (pH 7.0)、1%BSA、0.15M NaCl、2.5mM EDTA)に浸漬し、室温で2時間ブロッキングした。5%スキムミルク、2%BSAを含む緩衝液I'で40倍希釈した血清検体にブロッキングしたメンブレンを入れ、室温で4時間反応させた。反応後、メンブレンを緩衝液II(10mM Na-phosphate (pH 7.0)、0.15M NaCl、0.05%Tween 20)で3回洗浄後、2%スキムミルクを含む緩

衝液I'で100mu/mlに希釈した抗人IgG-POD標識抗体液(ヤギ抗体)に入れ、室温で30分間反応させた。反応後、メンブレンを取り出し、緩衝液IIで5回洗浄した。洗浄したメンブレンを発色液(20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5M NaCl、0.05%4-クロロ1ナフトール、0.018% H_2O_2 、16.7%メタノール)に浸漬し、室温で15分間反応させた。

【0094】結果を図5に示した。図5においては、非A非B型肝炎患者血清5例(No.1~No.5)と健康人血清5例(No.6~No.10)についてウエスタンブロットを行った結果を示したが、非A非B型肝炎患者血清でのみ、全てに強い陽性反応が検出され、発現した抗原が、非A非B型肝炎患者の診断に有用であることが示された。

【0095】

【発明の効果】本発明により、従来既報の配列と塩基配列、アミノ酸配列においてその相同性を異にするHCV

遺伝子がクローニングされた。本発明によって得られた塩基配列は非A非B型肝炎患者の核酸診断への利用が期待でき、又塩基配列をもとに作製されたポリペプチドは、非A非B型肝炎患者の抗体測定に応用できる他、モノクローナル抗体を作製することにより抗原検出系への応用が期待できる。特に、エンベロップ領域においてはワクチンへの応用も考えられ、HCV感染症の診断、予防に大きく貢献するものと考えられる。

【0096】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 701

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源

生物名: C型肝炎ウイルス

配列

```
CACTCCACCA TAGATCACTC CCCTGTGAGG AACTACTGTC TTCACGCAGA AAGCGTCTAG 60
CCATGGCGTT AGTATGAGTG TCGTACAGCC TCCAGGCCCG CCCCTCCCGG GAGAGCCATA 120
GTGGTCTGCG GAACCGGTGA GTACACCGGA ATTGCCGGGA AGACTGGGTC CTTTCTTGGA 180
TAAACCCACT CTATGCCCGG CCATTGGGGC GTGCCCGGCG AAGACTGCTA GCCGAGTAGC 240
GTTGGGTTGC GAAAGGCCTT GTGGTACTGC CTGATAGGGT GCTTGCGAGT GCCCGGGGAG 300
GTCTCGTAGA CCGTGCACC ATG AGC ACA AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC 352
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr
1 5 10
CAC AGA AAC ACT AAC CGT CGC CCA CAA GAC GTT AAG TTT CCG GGC GGC 400
```

```
His Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly
15 20 25
GGC CAG ATC GTT GGC GGA GTA TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA 448
Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg
30 35 40
TTG GGT GTG CGC ACG ACA AGG AAG ACT TCG GAG CGG TCC CAG CCA CGT 496
Leu Gly Val Arg Thr Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg
45 50 55
GGG GAG CGC CAG CCC ATC CCC AAA GAT CGG CGC CCC GCT GGC AAG TCC 544
Gly Glu Arg Gln Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Pro Ala Gly Lys Ser
60 65 70 75
TGG GGA AAA CCA GGA TAC CCT TGG CCT CTA TAT GGG AAT GAG GGA CTT 592
Trp Gly Lys Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu
80 85 90
GGC TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCC CCC CGA GGT TCC CGT CCC TCT TGG 640
Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp
95 100 105
GGC CCC ACT GAC CCC CGG CAT AGG TCG CGC AAC GTG GGT AAG GTC ATC 688
Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile
110 115 120
```

GAC ACC CTA ACG T

701

Asp Thr Leu Thr

125

配列番号: 2

配列の長さ: 910

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源

生物名: C型肝炎ウイルス

配列

TCG TCA GGA TGC CCC GGA CGC CTG TCC GCC TGC CGC AAT ATC GAT GCC	48
Ser Ser Gly Cys Pro Gly Arg Leu Ser Ala Cys Arg Asn Ile Asp Ala	
5 10 15	
TTC CGG ATA GGA TGG GGC ACC TTG CGA TAC GAG GAT AAC GTC ACC AAT	96
Phe Arg Ile Gly Trp Gly Thr Leu Arg Tyr Glu Asp Asn Val Thr Asn	
20 25 30	
CCA GAA GAT ATG AGA CCA TAT TGC TGG CAC TAC CCA CCA AAA CAG TGT	144
Pro Glu Asp Met Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Gln Cys	
35 40 45	
GGC ATA GTC CCC GCG AGG TCT GTG TGT GGT CCA GTG TAC TGT TTC ACC	192
Gly Ile Val Pro Ala Arg Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr	
50 55 60	
CCC AGC CCG GTA GTA GTA GGC ACG ACC GAT AAA CTT GGA GTG CCT ACC	240
Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Lys Leu Gly Val Pro Thr	
65 70 75 80	
TAC ACG TGG GGA GAG AAT GAG ACA GAT GTC TTC CTG TTG AAC AGC ACC	288
Tyr Thr Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr	
85 90 95	
CGA CCA CCG CAA GGG TCA TGG TTC GGC TGC ACG TGG ATG AAC TCC ACT	336
Arg Pro Pro Gln Gly Ser Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr	
100 105 110	
GGC TTC ACC AAG ACT TGT GGC GCA CCA CCT TGC CGC ACT AGA GCT GAC	384
Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro Cys Arg Thr Arg Ala Asp	
115 120 125	
TTC AAT GCC AGC ACG GAC CTG TTG TGC CCC ACA GAC TGT TTT AGG AAG	432
Phe Asn Ala Ser Thr Asp Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys	
130 135 140	
CAC CCC GAA GCC ACC TAT CTC AAA TGT GGT TCT GGG CCC TGG CTC ACG	480
His Pro Glu Ala Thr Tyr Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr	
145 150 155 160	
CCA AGG TGC CTG GTC GAC TAC CCC TAC AGG CTT TGG CAC TAC CCC TGC	528
Pro Arg Cys Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys	
165 170 175	
ACA TTC AAC TTC ACC ATC TTC AAG ATA AGG ATG TAT GTG GGG GGG GTT	576
Thr Phe Asn Phe Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val	
180 185 190	
GAG CAC AGG CTC ACG GCC GCG TGC AAT TTC ACT CGT GGG GAT CGC TGC	624
Glu His Arg Leu Thr Ala Ala Cys Asn Phe Thr Arg Gly Asp Arg Cys	
195 200 205	
GAC TTG GAG GAC AGG GAC AGA AGT CAA TTG TCT CCT TTG TTG CAC TCC	672
Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Gln Leu Ser Pro Leu Leu His Ser	
210 215 220	

ACC ACG GAG TGG GCC ATT CTG CCC TGC AGT TAC TCA GAC CTG CCC GCC 720
 Thr Thr Glu Trp Ala Ile Leu Pro Cys Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Ala
 225 230 235 240
 TTG TCG ACC GGT CTT CTC CAC CTC CAC CAA AAC ATC GTG GAC GTG CAA 768
 Leu Ser Thr Gly Leu Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln
 245 250 255
 TAT ATG TAT GGC CTG TCA CCT GCC CTT ACG AGC TAT GTC GTT CGA TGG 816
 Tyr Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr Ser Tyr Val Val Arg Trp
 260 265 270
 GAG TGG GTA GTA CTC TTA TTC CTG CTC TTA GCG GAC GCC AGG GTC TGC 864
 Glu Trp Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys
 275 280 285
 GCC TGC GTG TGG ATG CTC ATC TTG CTA GGC CAA GCC GAA GCA GCA C 910
 Ala Cys Val Trp Met Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala Glu Ala Ala
 290 295 300

配列番号: 3

配列の長さ: 852

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to genomic RNA

起源

生物名: C型肝炎ウイルス

配列

CTT GGT CAG GAG ATC CTC CTT GGC CCA GCT GAT GGC TAT ACC ACC AAG 48
 Leu Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Lys
 5 10 15
 GGG TGG AGG CTT CTC GCC CCC ATC ACC GCT TAC GCC CAG CAG ACG CGG 96
 Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg
 20 25 30
 GGT CTC CTG GGC ACT ATA GTG GTG AGC ATG ACG GGG CGC GAC AAG ACA 144
 Gly Leu Leu Gly Thr Ile Val Val Ser Met Thr Gly Arg Asp Lys Thr
 35 40 45
 GAG CAG GCC GGG GAA ATC CAA GTC CTG TCC ACA GTC ACT CAG TCC TTC 192
 Glu Gln Ala Gly Glu Ile Gln Val Leu Ser Thr Val Thr Gln Ser Phe
 50 55 60
 CTC GGA ACA TCC ATA TCG GGG GTC TTA TGG ACT GTT TAC CAC GGA GCT 240
 Leu Gly Thr Ser Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr Val Tyr His Gly Ala
 65 70 75 80
 GGC AAC AAG ACT CTA GCC GGC TCA CGC GGC CCG GTC ACG CAG ATG TAC 288
 Gly Asn Lys Thr Leu Ala Gly Ser Arg Gly Pro Val Thr Gln Met Tyr
 85 90 95
 TCG AGT GCC GAG GGA GAC TTG GTG GGG TGG CCC AGC CCC CCC GGG ACC 336
 Ser Ser Ala Glu Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro Ser Pro Pro Gly Thr
 100 105 110
 AAA TCT TTG GAG CCA TGC ACG TGT GGA GCA GTC GAC CTG TAC CTG GTC 384
 Lys Ser Leu Glu Pro Cys Thr Cys Gly Ala Val Asp Leu Tyr Leu Val
 115 120 125
 ACG CGG AAC GCT GAT GTC ATC CCG GCT CGA AGA CGC GGG GAC AAG CGG 432
 Thr Arg Asn Ala Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg Arg Gly Asp Lys Arg
 130 135 140
 GGA GCG CTA CTC TCC CCG AGA CCT CTC TCG ACC TTG AAG GGG TCC TCG 480
 Gly Ala Leu Leu Ser Pro Arg Pro Leu Ser Thr Leu Lys Gly Ser Ser
 145 150 155 160

```

GGG GGA CCG GTG CTT TGC CCT AGA GGC CAC GCT GTC GGG ATC TTC CGG   528
Gly Gly Pro Val Leu Cys Pro Arg Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg
      165              170              175
GCA GCT GTG TGC TCT CGG GGC GTG GCC AAG TCC ATA GAC TTC ATC CCC   576
Ala Ala Val Cys Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser Ile Asp Phe Ile Pro
      180              185              190
GTT GAA ACA CTC GAC ATC GCC ACG CGG TCT CCC ACT TTC AGT GAC AAC   624
Val Glu Thr Leu Asp Ile Ala Thr Arg Ser Pro Thr Phe Ser Asp Asn
      195              200              205
AGC ACA CCA CCA GCT GTG CCC CAG ACC TAT CAG GTC GGG TAC TTG CAT   672
Ser Thr Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln Val Gly Tyr Leu His
      210              215              220
GCT CCA ACT GGC AGC GGG AAG AGT ACC AAA GTC CCT GTC GCC TAC GCC   720
Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Val Ala Tyr Ala
      225              230              235
GCC CAG GGG TAC AAA GTG CTA GTA CTT AAT CCC TCG GTG GCT GCC ACC   768
Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr
      245              250              255
CTG GGG TTT GGG GCG TAT TTG TCC AAG GCG CAT GGC ATC AAT CCC AAC   816
Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Leu Ser Lys Ala His Gly Ile Asn Pro Asn
      260              265              270
ATT CGG ACT GGG GTC AGA ACT GTG ACG ACC GGG GAG   852
Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Val Thr Thr Gly Glu
      275              280

```

配列番号 : 4

配列の長さ : 819

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源

生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

```

AGC TTT AGA GAG CAG GGG TGG CGA CTC CTT GCG CCT ATC ACG GCC TAT   48
Ser Phe Arg Glu Gln Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr
      1              5              10              15
TCC CAA CAG ACG CGG GGC CTA ATT GGC TGC ATC ATC ACC AGC CTC ACG   96
Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Ile Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr
      20              25              30
GGT CGG GAC AAG AAC CAG GTC GAG GGA GAG GTT CAG GTG ATC TCT ACC   144
Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Val Ile Ser Thr
      35              40              45
GCT ACG CAA TCT TTC CTG GCG ACC TGC GTT AAC GGC GTG TGT TGG ACT   192
Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr
      50              55              60
GTC TAC CAT GGC GCC GGC TCA AAG ACC CTA GCC GGC CCA AAG GGC CCA   240
Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro
      65              70              75              80
GTC ACC CAA ATG TAC ACC AAT GTA GAC CAG GAC CTC GTC GGC TGG CAG   288
Val Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln
      85              90              95
GCG CCT TCC GGG TCG CGC TCC CTG ACA CCA TGC ACC TGT GGC AGC TCG   336
Ala Pro Ser Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser
      100              105              110

```

GAC CTT TAT TTG GTC ACG CGG CAT GCT GAC GTC ATT CCG GTG CGC CGG 384
 Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg
 115 120 125
 CGG GGT GAC AGC AGG GGG AGC TTA CTT TCC CCC AGG CCT GTC TCC TAC 432
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr
 130 135 140
 TTG AAG GGT TCC TCA GGT GGT CCA CTG CTC TGC CCC TTG GGG CAT GTC 480
 Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Leu Gly His Val
 145 150 155 160
 GTG GGC ATC TTC CGG GCC GCT GTG TGC ACC CGG GGG GTT GCG AAG GCG 528
 Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala
 165 170 175
 GTG GAC TTT GTA CCC GTT GAG TCT ATG GAA ACT ACT ATG CGG TCT CCG 576
 Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro
 180 185 190
 GTC TTC ACG GAT AAT TCA TCT CCT CCG GCC GTG CCG CAA TCA TTC CAA 624
 Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln
 195 200 205
 GTG GCC CAT CTG CAC GCT CCT ACC GGC AGC GGC AAG AGC ACT AAG GTG 672
 Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val
 210 215 220
 CCG GCT GCA TAT GCA GCC CAG GGG TAC AAG GTG CTC GTC CTC AAC CCG 720
 Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro
 225 230 235 240
 TCC GTT GCC GCC ACC TTG GGT TTT GGA GCG TAT ATG TCT AAG GCA CAT 768
 Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His
 245 250 255
 GGC ATT GAC CCC AAC ATC AGA ACA GGG GTA AGG ACC ATC GCT ACC GGC 816
 Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Ala Thr Gly
 260 265 270
 GCC 819
 Ala

配列番号 : 5

配列の長さ : 992

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源

生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

CA CAT GGT GTC GAC CCT AAC ATC AGA ACA GGG GTA AGG ACC ATC ACT 47
 His Gly Val Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr
 1 5 10 15
 ACG GGC GCC CCC ATT ACG TAC TCC ACC TAT GGC AAG TTC CTC GCC GAT 95
 Thr Gly Ala Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp
 20 25 30
 GGT GGT TGC TCT GGG GGC GCC TAT GAC ATC ATA ATT TGT GAT GAG TGC 143
 Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys
 35 40 45
 CAC TCA ACT GAC TCG ACT TCC ATC TTG GGC ATT GGT ACA GTT CTG GAC 191
 His Ser Thr Asp Ser Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp
 50 55 60
 CAA GCG GAG ACG GCT GGA GCG CGG CTC GTC GTG CTC GCC ACC GCT ACG 239

Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	
65						70					75					
CCT	CGG	GGA	TCA	GTC	ACC	GTG	CCG	CAT	CCC	AAT	ATC	GAG	GAG	GTG	GCC	287
Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Val	Ala	
80					85				90					95		
TTG	TCT	AAC	ACT	GGA	GAG	GTT	CCC	TTC	TAT	GGC	AAA	GCC	ATC	CCC	ATC	335
Leu	Ser	Asn	Thr	Gly	Glu	Val	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Ile	
				100				105				110				
GAG	GCC	ATC	AAG	GGG	GGG	AGG	CAT	CTC	ATC	TTC	TGC	CAT	TCC	AAG	AAG	383
Glu	Ala	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys	Lys	
			115				120					125				
AAA	TGT	GAC	GAG	CTC	GCC	GCA	AAG	CTG	TCG	GCC	CTC	GGA	GTC	AAT	GCT	431
Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	
			130				135					140				
GTA	GCA	TAT	TAC	CGG	GGC	CTT	GAT	GTG	TCC	GTG	ATA	CCG	ACA	AGC	GGA	479
Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	
			145				150					155				
GAC	GTG	GTT	GTT	GTG	GCA	ACA	GAC	GCT	CTA	ATG	ACG	GGC	TAC	ACT	GGC	527
Asp	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	
			160				165					170			175	
GAC	TTC	GAC	TCA	GTG	ATC	GAC	TGT	AAC	ACA	TGT	GTG	ACC	CAG	ACG	GTG	575
Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln	Thr	Val	
			180					185				190				
GAT	TTC	AGC	TTG	GAC	CCC	ACC	TTC	ACC	ATT	GAG	ACG	ACG	ACC	GTG	CCT	623
Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	
			195				200					205				
CAA	GAC	GCG	GTG	TCG	CGC	TCG	CAG	CGG	CGA	GGT	AGG	ACT	GGT	AGG	GGC	671
Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	
			210				215					220				
AGA	GGG	GGC	ATA	TAC	AGG	TTT	GTG	ACT	CCG	GGA	GAA	CGG	CCC	TCG	AGC	719
Arg	Gly	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Arg	Pro	Ser	Ser	
			225				230					235				
ATG	TTC	GAT	TCT	TCG	GTC	CTG	TGT	GAA	TGC	TAT	GAC	GCG	GGC	TGT	GCT	767
Met	Phe	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr	Asp	Ala	Gly	Cys	Ala	
			240				245					250			255	
TGG	TAT	GAG	CTC	ACG	CCC	GCT	GAG	ACC	ACA	GTT	AGG	TTG	CGG	GCT	TAC	815
Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Val	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	
			260					265				270				
CTA	AAT	ACA	CCA	GGG	TTG	CCC	GTC	TGC	CAA	GAC	CGC	CTG	GAG	TTC	TGG	863
Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp	Arg	Leu	Glu	Phe	Trp	
			275					280				285				
GAA	GGC	GTG	TTC	ACA	GGC	CTC	ACC	CAC	ATA	GAT	GCC	CAC	TTC	TTG	TCC	911
Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	
			290					295				300				
CAG	ACT	AAG	CAG	GCA	GGA	GAC	AAC	TTC	CCC	TAC	CTG	GTA	GCA	TAC	CAG	959
Gln	Thr	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val	Ala	Tyr	Gln	
			305					310				315				
GCT	ACG	GTG	TGT	GCC	AGG	GCC	CAG	GCT	CCA	CCT						992
Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Pro						
			320				325					330				

配列番号 : 6
 配列の長さ : 596
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

```

CTA ACG TGC GGC TTT GCC GAC CTC ATG GGG TGC ATC CCC GTT GTA GGC   48
Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Cys Ile Pro Val Val Gly
   1           5           10          15
GCC CCG CTT GGC GGC GTT GCC AGA GCT CTC GCG CAC GGC GTG AGA GTC   96
Ala Pro Leu Gly Gly Val Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val
           20           25           30
CTG GAG GAC GGG GTT AAT TAT GCA ACA GGG AAC TTA CCT GGT TGC TCC  144
Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser
           35           40           45
TTT TCT ATC TTC TTG CTG GCC CTA CTG TCC TGC ATC ACC ATT CCG GTC  192
Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Ile Thr Ile Pro Val
           50           55           60
TCC GCT GTC CAA GTG AAG AAC ACC AGT ACC GGC TAC ATG GTG ACT AAC  240
Ser Ala Val Gln Val Lys Asn Thr Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn
           65           70           75           80
GAC TGT TCC AAT GAC AGC ATC ACC TGG CAG CTT CAG GCC GCG GTC CTC  288
Asp Cys Ser Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu
           85           90           95
CAC GTC CCC GGG TGT GTC CCG TGC GAG AGA GTG GGG GAT ACG TCA CGG  336
His Val Pro Gly Cys Val Pro Cys Glu Arg Val Gly Asp Thr Ser Arg
           100          105          110
TGC TGG ATA CCG GTC TCG CCA AAC GTA GCT GTG CAG CGG CCT GGC GCC  384
Cys Trp Ile Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Arg Pro Gly Ala
           115          120          125
CTC ACG CAG GGC TTG CGG ACG CAC ATC GAC ATG GTT GTG ATG TCC GCC  432
Leu Thr Gln Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala
           130          135          140
ACG CTC TGC TCT GCT CTC TAT GTG GGG GAC CTT TGC GGC GGG GCG ATG  480
Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Ala Met
           145          150          155          160
CTC GCA GCC CAG ATG TTC GTC ATC TCG CCA CGA CAC CAC TGG TTT GTG  528
Leu Ala Ala Gln Met Phe Val Ile Ser Pro Arg His His Trp Phe Val
           165          170          175
CAG GAC TGC AAC TGC TCC ATA TAC CCT GGT GCC ATC ACT GGA CAC CGT  576
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Ala Ile Thr Gly His Arg
           180          185          190
ATG GCA TGG GAC ATG ATG AT                                     596
Met Ala Trp Asp Met Met
           195

```

配列番号 : 7
 配列の長さ : 1143
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

```

A GTG CTA GTA CTT AAT CCC TCG GTG GCT GCC ACC CTG GGG TTT GGG   46

```

Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	
1				5				10					15		
GCG	TAT	TTG	TCC	AAG	GCG	CAT	GGC	ATC	AAT	CCC	AAC	ATT	CGG	ACT	GGG
Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asn	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly
			20					25					30		
GTC	AGA	ACT	GTG	ACG	ACC	GGG	GAG	TCC	ATC	ACA	TAC	TCC	ACG	TAT	GGC
Val	Arg	Thr	Val	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly
			35					40					45		
AAA	TTC	CTC	GCC	GAT	GGG	GGC	TGC	TCG	GGC	GGC	GCC	TAT	GAC	ATC	ATC
Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile
			50					55					60		
ATA	TGC	GAT	GAA	TGC	CAC	TCT	GTG	GAT	GCT	ACC	ACC	ATA	CTT	GGC	ATC
Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Val	Asp	Ala	Thr	Thr	Ile	Leu	Gly	Ile
			65					70					75		
GGA	ACA	GTG	CTT	GAC	CAA	GCG	GAA	ACA	GCC	GGG	GTG	AGG	CTA	ACT	GTG
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Thr	Val
			80					85					90		
CTG	GCC	ACG	GCC	ACG	CCC	CCC	GGG	TCA	GTG	ACA	ACC	CCC	CAT	CCC	AAC
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Thr	Pro	His	Pro	Asn
			100					105					110		
ATA	GAG	GAG	ATA	GCC	CTC	GGG	CAT	GAG	GGT	GAG	ATC	CCC	TTC	TAT	GGG
Ile	Glu	Glu	Ile	Ala	Leu	Gly	His	Glu	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly
			115					120					125		
AAG	GCG	ATC	CCC	CTG	CCT	TAC	ATC	AAG	GGA	GGG	AGA	CAC	TTG	ATT	TTC
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Pro	Tyr	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe
			130					135					140		
TGC	CAC	TCA	AAG	AAG	AAG	TGT	GAC	GAG	CTC	GCG	GTG	GCC	CTT	CGG	GGC
Cys	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Arg	Gly
			145					150					155		
ATG	GGC	TTG	AAC	GCT	GTG	GCA	TAC	TAC	AGA	GGG	TTA	GAC	GTG	TCC	ATA
Met	Gly	Leu	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Ile
			160					165					170		
ATA	CCA	GCT	CAA	GGA	GAT	GTG	GTG	GTC	GTC	GCC	ACC	GAC	GCC	CTC	ATG
Ile	Pro	Ala	Gln	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met
			180					185					190		
ACG	GGG	TAT	ACT	GGG	GAC	TTC	GAC	TCC	GTG	ATC	GAC	TGC	AAT	GTA	GCG
Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Val	Ala
			195					200					205		
GTC	ACT	CAG	GCC	GTA	GAC	TTC	AGC	CTG	GAC	CCC	ACC	TTC	ACT	ATA	ACC
Val	Thr	Gln	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Thr
			210					215					220		
ACA	CAG	ACT	GTG	CCT	CAA	GAC	GCT	GTG	TCA	CGC	AGC	CAG	CGC	CGG	GGG
Thr	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Ser	Gln	Arg	Arg	Gly
			225					230					235		
CGC	ACG	GGT	AGG	GGA	AGA	TTG	GGC	ATT	TAT	AGG	TAT	GTT	TCC	ACC	GGT
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly
			240					245					250		
GAA	CGA	GCC	TCA	GGG	ATG	TTT	GAC	AGT	GTA	GTG	CTC	TGT	GAG	TGC	TAC
Glu	Arg	Ala	Ser	Gly	Met	Phe	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr
			260					265					270		

GAC GCG GGG GCC TCA TGG TAT GAG CTT ACA CCG TCG GAG ACT ACC GTC 862
 Asp Ala Gly Ala Ser Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ser Glu Thr Thr Val
 275 280 285
 AGG CTT AGG GCG TAT TTC AAC ACG CCT GGC TTG CCT GTG TGC CAA GAC 910
 Arg Leu Arg Ala Tyr Phe Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 290 295 300
 CAT CTT GAA TTC TGG GAG GCA GTT TTC ACC GGC CTC ACA CAC ATA GAT 958
 His Leu Glu Phe Trp Glu Ala Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 305 310 315
 GCC CAC TTC CTT TCC CAA ACA AAG CAG TCG GGG GAG AAC TTC GCT TAT 1006
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Ala Tyr
 320 325 330 335
 TTG GCA GCC TAT CAG GCT ACA GTG TGC GCC AGG GCG AGA GCC CCC CCC 1054
 Leu Ala Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Arg Ala Pro Pro
 340 345 350
 CCG TCT TGG GAC GTC ATG TGG AAG TGC TTG ACT CGA CTT AAG CCC ACG 1102
 Pro Ser Trp Asp Val Met Trp Lys Cys Leu Thr Arg Leu Lys Pro Thr
 355 360 365
 CTC GTG GGC CCT ACA CCT CTC CTG TAT CGT TTG GGC TCT GT 1143
 Leu Val Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ser
 370 375 380

配列番号 : 8

配列の長さ : 1134

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源

生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

CTA ACG TGC GGC TTT GCC GAC CTC ATG GGG TAC ATC CCC GTT GTA GGC 48
 Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly
 1 5 10 15
 GCC CCG CTT GGT GGC GTT GCC AGA GCT CTC GCG CAC GGC ATG AGA GTC 96
 Ala Pro Leu Gly Gly Val Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Met Arg Val
 20 25 30
 CTG GAG GAC GGG GTT AAT TAT GCA ACA GGG AAT TTA CCT GGT TGC TCC 144
 Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser
 35 40 45
 TTT TCT ATC TTC TTG CTG GCC CTA CTG TCC TGC ATC ACC ATT CCG GTC 192
 Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Ile Thr Ile Pro Val
 50 55 60
 TCC GCT GTC CAA GTG AAG AAC ACC AGT ACC GGC TAC ATG GTG ACT AAC 240
 Ser Ala Val Gln Val Lys Asn Thr Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn
 65 70 75 80
 GAC TGT TCC AAT GAC AGC ATC ACC TGG CAG CTT CAG GCC GCG GTC CTC 288
 Asp Cys Ser Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu
 85 90 95
 CAC GTC CCC GGG TGT GTC CCG TGC GAG AGA GTG GGG GAT ACG TCA CGG 336
 His Val Pro Gly Cys Val Pro Cys Glu Arg Val Gly Asp Thr Ser Arg
 100 105 110
 TGC TGG ATA CCG GTC TCG CCA AAC GTG GCT GTG CAG CGG CCT GGC GCC 384
 Cys Trp Ile Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Arg Pro Gly Ala
 115 120 125

CTC ACG CAG GGC TTG CGG ACG CAC ATC GAC ATG GTT GTG ATG TCC GCC	432
Leu Thr Gln Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala	
130 135 140	
ACG CTC TGC TCT GCT CTC TAT GTG GGG GAC CTT TGC GGC GGG GCG ATG	480
Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Ala Met	
145 150 155 160	
CTC GCA GCC CAG ATG TTC GTC ATC TCG CCA CGA CAC CAC TGG TTT GTG	528
Leu Ala Ala Gln Met Phe Val Ile Ser Pro Arg His His Trp Phe Val	
165 170 175	
CAG GAC TGC AAC TGC TCC ATA TAC CCT GGC GCC ATC ACT GGA CAC CGT	576
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Ala Ile Thr Gly His Arg	
180 185 190	
ATG GCA TGG GAC ATG ATG ATG AAC TGG TCG CCC ACG ACC ACC ATG ATC	624
Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Thr Met Ile	
195 200 205	
CTG GCG TAC GCG ATG CGT GTC CCC GAG GTC ATC ATA GAC ATC ATC AGC	672
Leu Ala Tyr Ala Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Ile Ser	
210 215 220	
GGG GCT CAT TGG GGC GTC ATG TTC GGC CTA GCT TAC TTC TCT ATG CAG	720
Gly Ala His Trp Gly Val Met Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln	
225 230 235 240	
GGG GCG TGG GCG AAA GTC ATT GTC ATC CTT CTG CTG ACC GCT GGG GTG	768
Gly Ala Trp Ala Lys Val Ile Val Ile Leu Leu Leu Thr Ala Gly Val	
245 250 255	
GAC GCG GAG ACC CTC ACA GTC GGG GGT GCC GCT GGG CGC GCT ACC GGT	816
Asp Ala Glu Thr Leu Thr Val Gly Gly Ala Ala Gly Arg Ala Thr Gly	
260 265 270	
GGC CTC ACC AGC CTC TTC TCT CCT GGT GCT CGG CAA AAT GTT CAG CTC	864
Gly Leu Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ala Arg Gln Asn Val Gln Leu	
275 280 285	
ATT AAC ACC AAT GGC AGT TGG TAC ATC AAC CGG ACT GCC CTG AAT TGC	912
Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp Tyr Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys	
290 295 300	
AAT GAC CCT TTG AAC ACC GGC TTC ATC GCG GCC CTG TTC TAC ACC AGC	960
Asn Asp Pro Leu Asn Thr Gly Phe Ile Ala Ala Leu Phe Tyr Thr Ser	
305 310 315 320	
AGG TTT AAC TCG TCA GGA TGC CCC GAA CGC CTG TCC GCC TGC CGC AAT	1008
Arg Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ser Ala Cys Arg Asn	
325 330 335	
ATC GAT GCC TTC CGG ATA GGA TGG GGC ACC TTG CAA TAC GAG AAT AAT	1056
Ile Asp Ala Phe Arg Ile Gly Trp Gly Thr Leu Gln Tyr Glu Asn Asn	
340 345 350	
GTC ACC AAT CCA ACA GAT ATG AGA CCA TAT TGC TGG CAC TAC CCA CCA	1104
Val Thr Asn Pro Thr Asp Met Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro	
355 360 365	
AAA CAG TGT GGC ATA GTC CCC GCG AGG TCT	1134
Lys Gln Cys Gly Ile Val Pro Ala Arg Ser	
370 375	

配列番号 : 9

配列の長さ : 1664

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

配列の種類：cDNA to genomic RNA

生物名：C型肝炎ウイルス

配列

C GTT CGA TGG GAG TGG GTA GTA CTC TTG TTC CTG CTC TTG GCG GAC	46
Val Arg Trp Glu Trp Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp	
1 5 10 15	
GCC AGG GTC TGC GCC TGC GTG TGG ATG CTC ATC TTG CTA GGC CAA GCC	94
Ala Arg Val Cys Ala Cys Val Trp Met Leu Ile Leu Leu Gly Gln Ala	
20 25 30	
GAA GCA GCA CTG GAG AAG CTG GTC GTC TTG CAC GCT GCA AGC GCG GCT	142
Glu Ala Ala Leu Glu Lys Leu Val Val Leu His Ala Ala Ser Ala Ala	
35 40 45	
AGT TGC AAC GGC TTC CTG TAC TTT GTC ATC TTT TTT GTG GCT GCT TGG	190
Ser Cys Asn Gly Phe Leu Tyr Phe Val Ile Phe Phe Val Ala Ala Trp	
50 55 60	
TAC ATC AGG GGT CGG GCG GTC CCC TTG GCT ACC TAT TCC CTC ACT GGC	238
Tyr Ile Arg Gly Arg Ala Val Pro Leu Ala Thr Tyr Ser Leu Thr Gly	
65 70 75	
CTA TGG CCC TTT TGC CTG CTG CTC CTA GCA CTG CCT CAA CAG GCC TAT	286
Leu Trp Pro Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gln Gln Ala Tyr	
80 85 90 95	
GCT TAT GAC ACA TCT GTG CAT GGA CAG ATA GGC GTG GCT TTG CTG GTG	334
Ala Tyr Asp Thr Ser Val His Gly Gln Ile Gly Val Ala Leu Leu Val	
100 105 110	
TTA ATT ACC CTT TTT ACA CTT ACC CCG GCA TAT AAG ACC CTT CTC AGC	382
Leu Ile Thr Leu Phe Thr Leu Thr Pro Ala Tyr Lys Thr Leu Leu Ser	
115 120 125	
CGG TGT CTG TGG TGG TTG TGC TAT CTC CTG ACC CTG GGG GAA GCT ATG	430
Arg Cys Leu Trp Trp Leu Cys Tyr Leu Leu Thr Leu Gly Glu Ala Met	
130 135 140	
GTC CAG GAG TGG GCA CCA TCC ATG CAG GCG CGC GGC GGC CGT GAT GGC	478
Val Gln Glu Trp Ala Pro Ser Met Gln Ala Arg Gly Gly Arg Asp Gly	
145 150 155	
ACC ATA TGG GCC GTC ACC ATG TTC TGC CCG GGT GTA GTG TTT GAT ATA	526
Thr Ile Trp Ala Val Thr Met Phe Cys Pro Gly Val Val Phe Asp Ile	
160 165 170 175	
ACC AAG TGG CTT TTG GCG GTG CTT GGG CCC AGT TAC CTC CTA AGA GAA	574
Thr Lys Trp Leu Leu Ala Val Leu Gly Pro Ser Tyr Leu Leu Arg Glu	
180 185 190	
GCT TTG ACG CGG GTG CCG TAT TTC GTC AGG GCT CAC GCT CTG TTG AGG	622
Ala Leu Thr Arg Val Pro Tyr Phe Val Arg Ala His Ala Leu Leu Arg	
195 200 205	
ATG TGC ACC ATG GTA AGG CAC CTC GCA GGA GGT AGA TAC GTC CAG ATG	670
Met Cys Thr Met Val Arg His Leu Ala Gly Gly Arg Tyr Val Gln Met	
210 215 220	
ACG CTA TTA GCC CTT GGT AGA TGG ACC GGC ACT TAC ATC TAT GAC CAC	718
Thr Leu Leu Ala Leu Gly Arg Trp Thr Gly Thr Tyr Ile Tyr Asp His	
225 230 235	
CTC ACC CCT ATG TCG GAT TGG GCT GCT AGC GGC CTG CGG GAC TTG GCG	766
Leu Thr Pro Met Ser Asp Trp Ala Ala Ser Gly Leu Arg Asp Leu Ala	

240	245	250	255	
GTC GCT GTG GAG CCC ATC ATC TTC AGT CCG ATG GAG AAG AAA GTC ATC				814
Val Ala Val Glu Pro Ile Ile Phe Ser Pro Met Glu Lys Lys Val Ile				
	260	265	270	
GTT TGG GGA GCG GAG ACG GCC GCA TGC GGG GAC ATC ATA CAC GGA CTC				862
Val Trp Gly Ala Glu Thr Ala Ala Cys Gly Asp Ile Ile His Gly Leu				
	275	280	285	
CCC GTG TCC GCC CGA CTT GGT CAG GAG ATC CTC CTT GGC CCA GCT GAT				910
Pro Val Ser Ala Arg Leu Gly Gln Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp				
	290	295	300	
GGC TAT ACC ACC AAG GGG TGG AGG CTT CTC GCC CCC ATC ACT GCC TAC				958
Gly Tyr Thr Thr Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr				
	305	310	315	
GCC CAG CAG ACG CGG GGT CTC CTG GGC ACC ATA GTG GTG AGC ATG ACG				1006
Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly Thr Ile Val Val Ser Met Thr				
	320	325	330	335
GGG CGC GAC AAG ACA GAG CAG GCC GGG GAA ATC CAA GTC CTG TCC ACA				1054
Gly Arg Asp Lys Thr Glu Gln Ala Gly Glu Ile Gln Val Leu Ser Thr				
	340	345	350	
GTC ACT CAG TCC TTC CTC GGA ACA TCC ATA TCG GGG GTC TTA TGG ACT				1102
Val Thr Gln Ser Phe Leu Gly Thr Ser Ile Ser Gly Val Leu Trp Thr				
	355	360	365	
GTT TAC CAC GGA GCT GGC AAC AAG ACT CTA GCC GGC TCA CGC GGC CCG				1150
Val Tyr His Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Ala Gly Ser Arg Gly Pro				
	370	375	380	
GTC ACG CAG ATG TAC TCG AGT GCC GAG GGA GAC CTG GTG GGG TGG CCC				1198
Val Thr Gln Met Tyr Ser Ser Ala Glu Gly Asp Leu Val Gly Trp Pro				
	385	390	395	
AGC CCC CCC GGG ACC AAA TCT TTG GAG CCA TGC ACG TGT GGA GCG GTC				1246
Ser Pro Pro Gly Thr Lys Ser Leu Glu Pro Cys Thr Cys Gly Ala Val				
	400	405	410	415
GAC CTG TAC CTG GTC ACG CGG AAC GCT GAT GTC ATC CCG GCT CGA AGA				1294
Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg Asn Ala Asp Val Ile Pro Ala Arg Arg				
	420	425	430	
CGC GGG GAC AAG CGG GGA GCG CTA CTC TCC CCG AGA CCT CTC TCG ACC				1342
Arg Gly Asp Lys Arg Gly Ala Leu Leu Ser Pro Arg Pro Leu Ser Thr				
	435	440	445	
TTG AAG GGG TCC TCG GGG GGA CCG GTG CTT TGC CCT AGA GGC CAC GCT				1390
Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Val Leu Cys Pro Arg Gly His Ala				
	450	455	460	
GTC GGG ATC TTC CGG GCA GCT GTG TGC TCT CCG GGC GTG GCC AAG TCC				1438
Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Ser Arg Gly Val Ala Lys Ser				
	465	470	475	
ATA GAC TTC ATC CCC GTT GAA ACA CTC GAC ATC GTC ACG CGG TCT CCC				1486
Ile Asp Phe Ile Pro Val Glu Thr Leu Asp Ile Val Thr Arg Ser Pro				
	480	485	490	495
ACT TTC AGT GAC AAC AGC ACA CCA CCA GCT GTG CCC CAG ACC TAT CAG				1534
Thr Phe Ser Asp Asn Ser Thr Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Tyr Gln				
	500	505	510	
GTC GGG TAC TTG CAT GCT CCA ACT GGC AGC GGG AAG AGT ACC AAA GTC				1582

Val Gly Tyr Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val
 515 520 525
 CCT GTC GCC TAC GCC GCC CAG GGG TAC AAA GTG CTA GTG CTT AAT CCC 1630
 Pro Val Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro
 530 535 540
 TCG GTG GCT GCC ACC CTG GGG TTT GGG GCG TAT T 1664
 Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr
 545 550

配列番号: 10
 配列の長さ: 667
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名: C型肝炎ウイルス

配列

A ACA AAG CAG TCG GGG GAG AAC TTC GCT TAT TTG GCA GCC TAT CAG 46
 Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Ala Tyr Leu Ala Ala Tyr Gln
 1 5 10 15
 GCT ACA GTG TGC GCC AGG GCG AGA GCC CCC CCC CCG TCT TGG GAC GTC 94
 Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Arg Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Val
 20 25 30
 ATG TGG AAG TGC TTG ACT CGA CTT AAG CCC ACG CTC GTG GGC CCT ACA 142
 Met Trp Lys Cys Leu Thr Arg Leu Lys Pro Thr Leu Val Gly Pro Thr
 35 40 45
 CCT CTC CTG TAT CGT TTG GGC TCT GTT ACC AAC GAG GTC ACC CTC ACA 190
 Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ser Val Thr Asn Glu Val Thr Leu Thr
 50 55 60
 CAT CCT GTG ACA AAA TAC ATC GCC ACG TGC ATG CAA GCT GAC CTC GAG 238
 His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Ala Thr Cys Met Gln Ala Asp Leu Glu
 65 70 75
 GTC ATG ACC AGC ACA TGG GTC CTG GCC GGG GGA GTC TTG GCA GCC GTC 286
 Val Met Thr Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly Gly Val Leu Ala Ala Val
 80 85 90 95
 GCT CGT TAT TGC CTG GCG ACC GGG TGT GTT TCC ATC ATC GGC CGT TTG 334
 Ala Arg Tyr Cys Leu Ala Thr Gly Cys Val Ser Ile Ile Gly Arg Leu
 100 105 110
 CAT ATC AAC CAG CGA GCC GTC GTT GCA CCG GAC AAG GAG GTC CTT TAT 382
 His Ile Asn Gln Arg Ala Val Val Ala Pro Asp Lys Glu Val Leu Tyr
 115 120 125
 GAG GCT TTT GAT GAG ATG GAG GAA TGT GCC TCT AGA GCG GCT CTC ATT 430
 Glu Ala Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ala Leu Ile
 130 135 140
 GAA GAG GGG CAA CGG ATA GCC GAG ATG CTG AAG TCC AAG ATC CAG GGC 478
 Glu Glu Gly Gln Arg Ile Ala Glu Met Leu Lys Ser Lys Ile Gln Gly
 145 150 155
 TTA CTG CAG CAA GCC TCC AAG CAG GCC CAA GAC ATA AAA CCC GCT GTG 526
 Leu Leu Gln Gln Ala Ser Lys Gln Ala Gln Asp Ile Lys Pro Ala Val
 160 165 170 175
 CAG ACT TCA TGG CCC AAG GTG GAG CAG TTC TGG GCC AAG CAC ATG TGG 574
 Gln Thr Ser Trp Pro Lys Val Glu Gln Phe Trp Ala Lys His Met Trp
 180 185 190
 AAC TTC ATC AGT GGC ATC CAA TAC CTT GCA GGA CTG TCA ACA CTG CCG 622

Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro
 195 200 205
 GGG AAC CCC GCT GTG GCT TCC ATG ATG GCA TTC AGT GCC GCT CTC 667
 Gly Asn Pro Ala Val Ala Ser Met Met Ala Phe Ser Ala Ala Leu
 210 215 220

配列番号: 11
 配列の長さ: 1120
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名: C型肝炎ウイルス

配列

A GGG AAC CCC GCT GTG GCT TCC ATG ATG GCA TTC AGT GCC GCT CTC 46
 Gly Asn Pro Ala Val Ala Ser Met Met Ala Phe Ser Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 ACC AGC CCT TTG TCA ACC AAC ACC ACT GTA CTC CTC AAC ATC CTG GGA 94
 Thr Ser Pro Leu Ser Thr Asn Thr Thr Val Leu Leu Asn Ile Leu Gly
 20 25 30
 GGC TGG CTG GCG TCC CAA ATT GCG CCA CCC GCG GGG GCC ACC GGC TTC 142
 Gly Trp Leu Ala Ser Gln Ile Ala Pro Pro Ala Gly Ala Thr Gly Phe
 35 40 45
 GTT GTC AGT GGT CTG GTG GGG GCT GCC GTG GGC AGC ATA GGC CTG GGT 190
 Val Val Ser Gly Leu Val Gly Ala Ala Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly
 50 55 60
 AAG GTG CTG GTG GAC ATC CTG GCA GGG TAC GGT GCG GGC ATT TCG GGG 238
 Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Ile Ser Gly
 65 70 75
 GCC CTC GTC GCA TTT AAG ATC ATG TCT GGC GAG AAG CCT TCC ATG GAG 286
 Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Lys Pro Ser Met Glu
 80 85 90 95
 GAT GTC ATC AAC CTG TTG CCT GGG ATT CTG TCT CCG GGT GCC CTG GTG 334
 Asp Val Ile Asn Leu Leu Pro Gly Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val
 100 105 110
 GTG GGA GTC ATC TGC GCG GCC ATT CTG CGC CGC CAC GTG GGA CCG GGG 382
 Val Gly Val Ile Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly
 115 120 125
 GAA GGC GCG GTT CAA TCG ATG AAT AGG CTC ATC GCC TTC GCT TCC AGG 430
 Glu Gly Ala Val Gln Ser Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg
 130 135 140
 GGA AAC CAC GTC GCC CCC ACC CAC TAC GTG ACG GAG TCG GAT GCG TCG 478
 Gly Asn His Val Ala Pro Thr His Tyr Val Thr Glu Ser Asp Ala Ser
 145 150 155
 CAG CGA GTG ACC CAA ATG CTT GGC TCC CTT ACT ATA ACC AGC CTA CTC 526
 Gln Arg Val Thr Gln Met Leu Gly Ser Leu Thr Ile Thr Ser Leu Leu
 160 165 170 175
 AGA AGA CTC CAC AAT TGG ATC ACT GAG GAC TGC CCT ATC CCA TGC GCC 574
 Arg Arg Leu His Asn Trp Ile Thr Glu Asp Cys Pro Ile Pro Cys Ala
 180 185 190
 GGC TCG TGG CTC CGC GAC GTG TGG GAC TGG GTC TGC ACT ATC CTA ACA 622
 Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Val Cys Thr Ile Leu Thr
 195 200 205
 GAC TTT AAG AAC TGG CTG TCC TCC AAG TTG TTC CCA AAG ATG CTC GGC 670

Asp Phe Lys Asn Trp Leu Ser Ser Lys Leu Phe Pro Lys Met Leu Gly	
210 215 220	
CTC CCC TTT ATC TCT TGC CAA AAG GGG TAT AAG GGC GTG TGG GCC GGC	718
Leu Pro Phe Ile Ser Cys Gln Lys Gly Tyr Lys Gly Val Trp Ala Gly	
225 230 235	
ACT GGT ATC ATG ACC ACA CGG TGT CCT TGC GGT GCC AAC ATC TCT GGC	766
Thr Gly Ile Met Thr Thr Arg Cys Pro Cys Gly Ala Asn Ile Ser Gly	
240 245 250 255	
AAC GTC CGC TTG GGC TCC ATG AGA ATC ACA GGG CCT AAA ACC TGC ATG	814
Asn Val Arg Leu Gly Ser Met Arg Ile Thr Gly Pro Lys Thr Cys Met	
260 265 270	
AAC ACT TGG CAG GGG ACC TTC CCC ATC AAT TGT TAC ACG GAG GGC CAG	862
Asn Thr Trp Gln Gly Thr Phe Pro Ile Asn Cys Tyr Thr Glu Gly Gln	
275 280 285	
TGC ATG CCG AAA CCC GCG CTA AAC TTC AAG ACC GCC ATC TGG AGA GTG	910
Cys Met Pro Lys Pro Ala Leu Asn Phe Lys Thr Ala Ile Trp Arg Val	
290 295 300	
GCG GCC TCA GAA TAC GCG GAG GTG ACG CGG CAC GGG TCA TAC TCC TAC	958
Ala Ala Ser Glu Tyr Ala Glu Val Thr Arg His Gly Ser Tyr Ser Tyr	
305 310 315	
ATA ACG GGA TTG ACC ACT GAC AAT TTG AAG GTT CCC TGC CAA CTG CCC	1006
Ile Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asn Leu Lys Val Pro Cys Gln Leu Pro	
320 325 330 335	
TCG CCA GAG TTT TTC TCC TGG GTG GAT GGA GTG CAA ATT CAT AGG TTC	1054
Ser Pro Glu Phe Phe Ser Trp Val Asp Gly Val Gln Ile His Arg Phe	
340 345 350	
GCT CCT ACG CCA AAG CCG TTT TTC CGG GAT GAG GTC TCG TTT TCC GTT	1102
Ala Pro Thr Pro Lys Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val Ser Phe Ser Val	
355 360 365	
GGA CTC AAC TCG TTT GTC	1120
Gly Leu Asn Ser Phe Val	
370	

配列番号 : 12
 配列の長さ : 1174
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

T ACG CCA AAG CCG TTT TTC CGG GAT GAG GTC TCG TTT TCC GTT GGA	46
Thr Pro Lys Pro Phe Phe Arg Asp Glu Val Ser Phe Ser Val Gly	
1 5 10 15	
CTC AAT TCG TTC GTC GTC GGG TCT CAG CTT CCT TGC GAC CCT GAG CCC	94
Leu Asn Ser Phe Val Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Asp Pro Glu Pro	
20 25 30	
GAC ACT GAC GTA CTG ATG TCC GTG CTA ACA GAT CCG TCC CAC ATC ACG	142
Asp Thr Asp Val Leu Met Ser Val Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr	
35 40 45	
GCG GAG GCA GCA GCG CGG CGC TTG GCG CGG GGG TCA CCC CCA TCC GAG	190
Ala Glu Ala Ala Ala Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Glu	
50 55 60	
GCA AGC TCC TCA GCG AGC CAG TTG TCA GCG CCA TCG CTG CGA GCC ACC	238

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Arg Ala Thr	
65 70 75	
TGC ACC ACA CAC GGC GCG ATC TAT GAT ATA GAC ATG GTG GAT GCT AAC	286
Cys Thr Thr His Gly Ala Ile Tyr Asp Ile Asp Met Val Asp Ala Asn	
80 85 90 95	
TTG TTC ATG GGG GGC GAC GTG ACT CGG ATA GAG TCT GAG TCC AGG GTG	334
Leu Phe Met Gly Gly Asp Val Thr Arg Ile Glu Ser Glu Ser Arg Val	
100 105 110	
GTC GTT CTG GAC TAT CTC GAT TCA ATG ACC GAA AAG AAG AGC GAC TAC	382
Val Val Leu Asp Tyr Leu Asp Ser Met Thr Glu Lys Lys Ser Asp Tyr	
115 120 125	
GAG CCC TCG ATA CCA TCG GAG TAC ATG CTC CCC AAA ACC AAG TTC CCG	430
Glu Pro Ser Ile Pro Ser Glu Tyr Met Leu Pro Lys Thr Lys Phe Pro	
130 135 140	
CCA GCC TTA CCA GTC TGG GCA CGG CCT GAT TAC AAT CCA CCG CTC GTG	478
Pro Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val	
145 150 155	
GAA TCG TCC AAG AGG CCA GAC TAC CAA CCG CCC ACC GTT GCG GGC TGC	526
Glu Ser Ser Lys Arg Pro Asp Tyr Gln Pro Pro Thr Val Ala Gly Cys	
160 165 170 175	
GCT CTC CCC CCA CCT AAG AAG ACC CCG ACG CCC CCC CCA AGG AGG CGC	574
Ala Leu Pro Pro Pro Lys Lys Thr Pro Thr Pro Pro Pro Arg Arg Arg	
180 185 190	
CGG ACA GTG GGT CTG AGC GAG AGC ACC GTA GCA GAT GCC CTC CAA CAG	622
Arg Thr Val Gly Leu Ser Glu Ser Thr Val Ala Asp Ala Leu Gln Gln	
195 200 205	
CTG GCC ATC AAG ACC TTC GGC CAG CCC CTC CCA AGC GGT GAT CCA GGC	670
Leu Ala Ile Lys Thr Phe Gly Gln Pro Leu Pro Ser Gly Asp Pro Gly	
210 215 220	
CAT TCC ACG GGG GCG GAC GCC GCC GAT TCC GGC GGT CGG ACG CCC CCC	718
His Ser Thr Gly Ala Asp Ala Ala Asp Ser Gly Gly Arg Thr Pro Pro	
225 230 235	
GAT GAC TCA GCT CTT TCG GAG ACA GGT TCT ACC TCC TCC ATG CCC CCC	766
Asp Asp Ser Ala Leu Ser Glu Thr Gly Ser Thr Ser Ser Met Pro Pro	
240 245 250 255	
CTC GAG GGG GAG CCT GGG GAC CCA GAC CTG GAG CCC GAG CAG GTA GAG	814
Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Glu Pro Glu Gln Val Glu	
260 265 270	
CTC CAA CCT CCC CCC CAG AGG GGG GGG GCA GCT CCC GGT TCG GAC TCG	862
Leu Gln Pro Pro Pro Gln Arg Gly Gly Ala Ala Pro Gly Ser Asp Ser	
275 280 285	
GGG TCT TGG TCG ACT TGC TCC GAA GAG GAT GAC TCC GTC GTG TGC TGC	910
Gly Ser Trp Ser Thr Cys Ser Glu Glu Asp Asp Ser Val Val Cys Cys	
290 295 300	
TCC ATG TCG TAC TCC TGG ACC GGG GCT CTA ATA ACT CCT TGT AGT CCC	958
Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ser Pro	
305 310 315	
GAA GAG GAA AAG TTG CCA ATC AAC CCC TTG AGC AAC TCG CTG TTG CGA	1006
Glu Glu Glu Lys Leu Pro Ile Asn Pro Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg	
320 325 330 335	

```

TAC CAC AAT AAG GTG TAC TGT ACT ACA TCA AAG AGC GCC TCA TTG AGA 1054
Tyr His Asn Lys Val Tyr Cys Thr Thr Ser Lys Ser Ala Ser Leu Arg
      340      345      350
GCT AAA AAG GTG ACT TTC GAC AGG ATG CAA GTG CTC GAC GCC CAT TAT 1102
Ala Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Met Gln Val Leu Asp Ala His Tyr
      355      360      365
GAC TCA GTC TTA AAG GAC ATC AAG CTA GCG GCC TCC AAG GTC AGC GCA 1150
Asp Ser Val Leu Lys Asp Ile Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Ser Ala
      370      375      380
AGG CTC CTC ACC TTG GAG GAG GCG 1174
Arg Leu Leu Thr Leu Glu Glu Ala
      385      390

```

配列番号 : 13

配列の長さ : 1057

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to genomic RNA

起源

生物名 : C型肝炎ウイルス

配列

```

G CTG TTG CGA TAC CAC AAT AAG GTG TAC TGT ACT ACA TCA AAG AGC 46
Leu Leu Arg Tyr His Asn Lys Val Tyr Cys Thr Thr Ser Lys Ser
      1      5      10      15
GCC TCA TTG AGA GCT AAA AAG GTG ACT TTC GAC AGG ATG CAA GTG CTC 94
Ala Ser Leu Arg Ala Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Met Gln Val Leu
      20      25      30
GAC GCC CAT TAT GAC TCA GTC TTA AAG GAC ATC AAG CTA GCG GCC TCC 142
Asp Ala His Tyr Asp Ser Val Leu Lys Asp Ile Lys Leu Ala Ala Ser
      35      40      45
AAG GTC AGC GCA AGG CTC CTC ACC TTG GAG GAG GCG TGC CGA TTG ACT 190
Lys Val Ser Ala Arg Leu Leu Thr Leu Glu Glu Ala Cys Arg Leu Thr
      50      55      60
CCA CCC CAT TCC GCA AGA TCC AAA TAC GGG TTT GGG GCC AAG GAG GTC 238
Pro Pro His Ser Ala Arg Ser Lys Tyr Gly Phe Gly Ala Lys Glu Val
      65      70      75
CGC AGC TTG TCC GGG AGG GCC GTC AAC CAC ATC AAG TCC GTG TGG AAG 286
Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ala Val Asn His Ile Lys Ser Val Trp Lys
      80      85      90      95
GAC CTC CTG GAA GAC CCA CAA ACA CCA ATT CCT ACA ACC ATC ATG GCC 334
Asp Leu Leu Glu Asp Pro Gln Thr Pro Ile Pro Thr Thr Ile Met Ala
      100      105      110
AAA AAT GAG GTG TTC TGC GTG GAC CCC ACC AAG GGG GGT AAG AAG CCA 382
Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Asp Pro Thr Lys Gly Gly Lys Lys Pro
      115      120      125
GCT CGC CTT ATC GTT TAC CCT GAT CTC GGC GTC AGG GTC TGC GAG AAG 430
Ala Arg Leu Ile Val Tyr Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys
      130      135      140
ATG GCC CTT TAT GAT GTC ACA CAA AAG CTT CCT CAG GCG GTG ATG GGG 478
Met Ala Leu Tyr Asp Val Thr Gln Lys Leu Pro Gln Ala Val Met Gly
      145      150      155
GCT TCT TAT GGA TTT CAG TAC TCC CCC GCT CAA CGG GTG GAG TTT CTC 526
Ala Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Ala Gln Arg Val Glu Phe Leu
      160      165      170      175

```

TTG AAA GCA TGG GCG GAC AAG AAA GAC CCT ATG GGT TTT TCG TAT GAT	574
Leu Lys Ala Trp Ala Asp Lys Lys Asp Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp	
180 185 190	
ACC CGA TGC TTT GAC TCA ACC GTC ACT GAG AGA GAC ATC AGA ACT GAG	622
Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Arg Asp Ile Arg Thr Glu	
195 200 205	
GAG TCC ATA TAC CAG GCC TGC TCC CTG CCC GAG GAG GCC CGC ACT GCC	670
Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Cys Ser Leu Pro Glu Glu Ala Arg Thr Ala	
210 215 220	
ATA CGC TCG CTG ACT GAG AGA CTC TAC GTA GGA GGG CCC ATG TTC AAC	718
Ile Arg Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Met Phe Asn	
225 230 235	
AGC AAG GGC CAG GCC TGC GGG TAC AGG CGT TGC CGC GCC AGC GGC GTG	766
Ser Lys Gly Gln Ala Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val	
240 245 250 255	
CTC ACT ACT AGC ATG GGG AAC ACC ATC ACA TGC TAT GTG AAG GCC CTA	814
Leu Thr Thr Ser Met Gly Asn Thr Ile Thr Cys Tyr Val Lys Ala Leu	
260 265 270	
GCG GCT TGC AAG GCT GCG GGG ATA GTT GCG CCC ACA ATG CTG GTA TGC	862
Ala Ala Cys Lys Ala Ala Gly Ile Val Ala Pro Thr Met Leu Val Cys	
275 280 285	
GGC GAT GAC CTG GTT GTC ATC TCA GAA AGC CAG GGG ACT GAA GAG GAC	910
Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Ser Glu Ser Gln Gly Thr Glu Glu Asp	
290 295 300	
GAG CGG AAC CTG AGA GCC TTC ACG GAG GCT ATG ACC AGG TAT TCT GCC	958
Glu Arg Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala	
305 310 315	
CCT CCT GGT GAC CCC CCC AGA CCG GAA TAT GAC CTG GAG CTG ATA ACA	1006
Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr	
320 325 330 335	
TCT TGT TCC TCA AAT GTG TCT GTG GCA ATC AGC CCA CAG GGC CGC CGC	1054
Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Ile Ser Pro Gln Gly Arg Arg	
340 345 350	
AGA	1057
Arg	

配列番号 : 14
 配列の長さ : 648
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : cDNA to genomic RNA
 起源
 生物名 : C型肝炎ウイルス

C AGG TAT TCT GCC CCT CCT GGT GAC CCC CCC AGA CCG GAA TAT GAC	46
Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Arg Pro Glu Tyr Asp	
1 5 10 15	
CTG GAG CTG ATA ACA TCT TGT TCC TCA AAT GTG TCT GTG GCA ATC AGC	94
Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala Ile Ser	
20 25 30	
CCA CAG GGC CGC CGC AGA TAC TAC CTG TCC AGA GAC CCT ACC ACT CCA	142
Pro Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Tyr Leu Ser Arg Asp Pro Thr Thr Pro	
35 40 45	
ATT GCC CGG GCT GCC TGG GAA ACA GTT AGA CAC TCC CCT GTC AAT TCA	190

Ile	Ala	Arg	Ala	Ala	Trp	Glu	Thr	Val	Arg	His	Ser	Pro	Val	Asn	Ser	
50							55					60				
TGG	CTG	GGA	AAC	ATC	ATC	CAG	TAC	GCT	CCA	ACC	ATA	TGG	GTT	CGC	ATG	238
Trp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ile	Gln	Tyr	Ala	Pro	Thr	Ile	Trp	Val	Arg	Met	
65						70					75					
GTT	CTG	ATG	ACA	CAT	TTC	TTC	CCC	GTT	CTC	ATA	GCC	CAA	GAC	ACC	CTG	286
Val	Leu	Met	Thr	His	Phe	Phe	Pro	Val	Leu	Ile	Ala	Gln	Asp	Thr	Leu	
80					85				90				95			
GAC	CAG	AAC	CTA	AAT	TTT	GAA	ATG	TAC	GGA	TCG	GTG	TAC	TCC	GTG	AGT	334
Asp	Gln	Asn	Leu	Asn	Phe	Glu	Met	Tyr	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Val	Ser	
			100						105				110			
CCT	TTG	GAC	CTC	CCA	GCC	ATA	ATT	GAA	AGG	TTA	CAT	GGG	CTC	GAC	GCC	382
Pro	Leu	Asp	Leu	Pro	Ala	Ile	Ile	Glu	Arg	Leu	His	Gly	Leu	Asp	Ala	
			115				120					125				
TTT	TCT	CTG	CAC	ACA	TAC	ACT	CAC	CAC	GAA	CTG	ACG	CGG	GTG	GCT	TCG	430
Phe	Ser	Leu	His	Thr	Tyr	Thr	His	His	Glu	Leu	Thr	Arg	Val	Ala	Ser	
			130				135					140				
GCC	CTC	AGA	AAA	CTT	GGG	GCG	CCA	CCC	CTC	AGA	GCG	TGG	AAG	AGC	CGG	478
Ala	Leu	Arg	Lys	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Ala	Trp	Lys	Ser	Arg	
			145			150						155				
GCG	CGT	GCA	GTC	AGG	GCG	TCC	CTC	ATC	TCC	CAG	GGG	GGG	AGA	GCG	GCC	576
Ala	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Gln	Gly	Gly	Arg	Ala	Ala	
160					165				170				175			
GTT	TGC	GGC	CGC	TAT	CTC	TTC	AAC	TGG	GCG	GTG	AAG	ACC	AAG	CTC	AAA	574
Val	Cys	Gly	Arg	Tyr	Leu	Phe	Asn	Trp	Ala	Val	Lys	Thr	Lys	Leu	Lys	
					180				185				190			
CTC	ACT	CCA	TTG	CCG	GAG	GCA	CGC	CTC	CTG	GAT	TTA	TCC	AGT	TGG	TTC	622
Leu	Thr	Pro	Leu	Pro	Glu	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Trp	Phe	
					195			200					205			
ACC	GTC	GGC	GCC	GGC	GGG	GGC	GAC	AT								648
Thr	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Asp									
			210			215										

【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、PCRによるHCV#S14株および#4株のクローニング戦略を示す。図中、各領域に付した上側の数字はHC-J6上のヌクレオチド配列の位置を示し、また下側の数字は使用したPCRプライマーの名称を示す。なお、括弧内の数字はDNA断片の長さ(bp)を示す。

【図2】この図は、PCRによるHCV#S14株のクローニング戦略を示す。図中、各領域に付した上側の数字はHC-J6上のヌクレオチド配列の位置を示し、また下側の数字は使用したPCRプライマーの名称を示す。なお、括弧内の数字はDNA断片の長さ(bp)を示す。

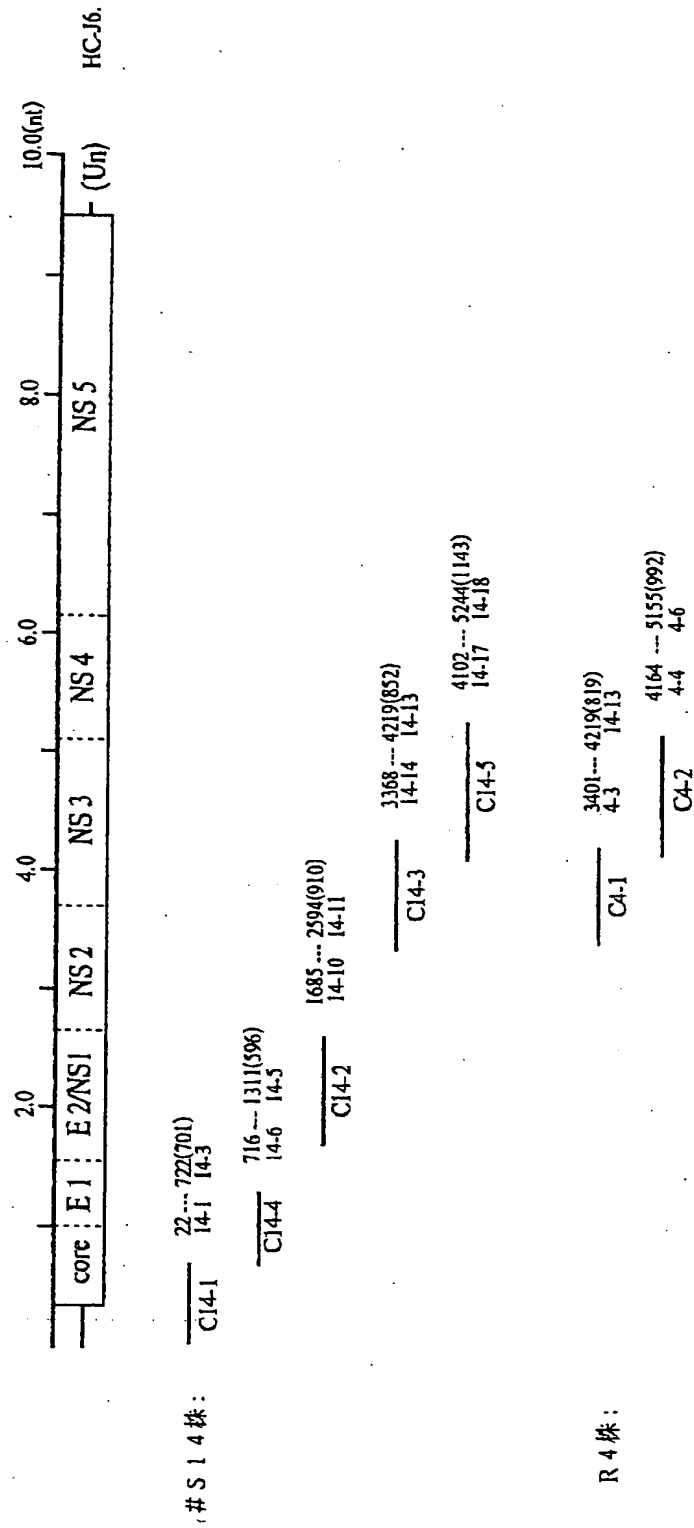
す。

【図3】この図は、クローニング用ベクターpBMの構築工程を示す。

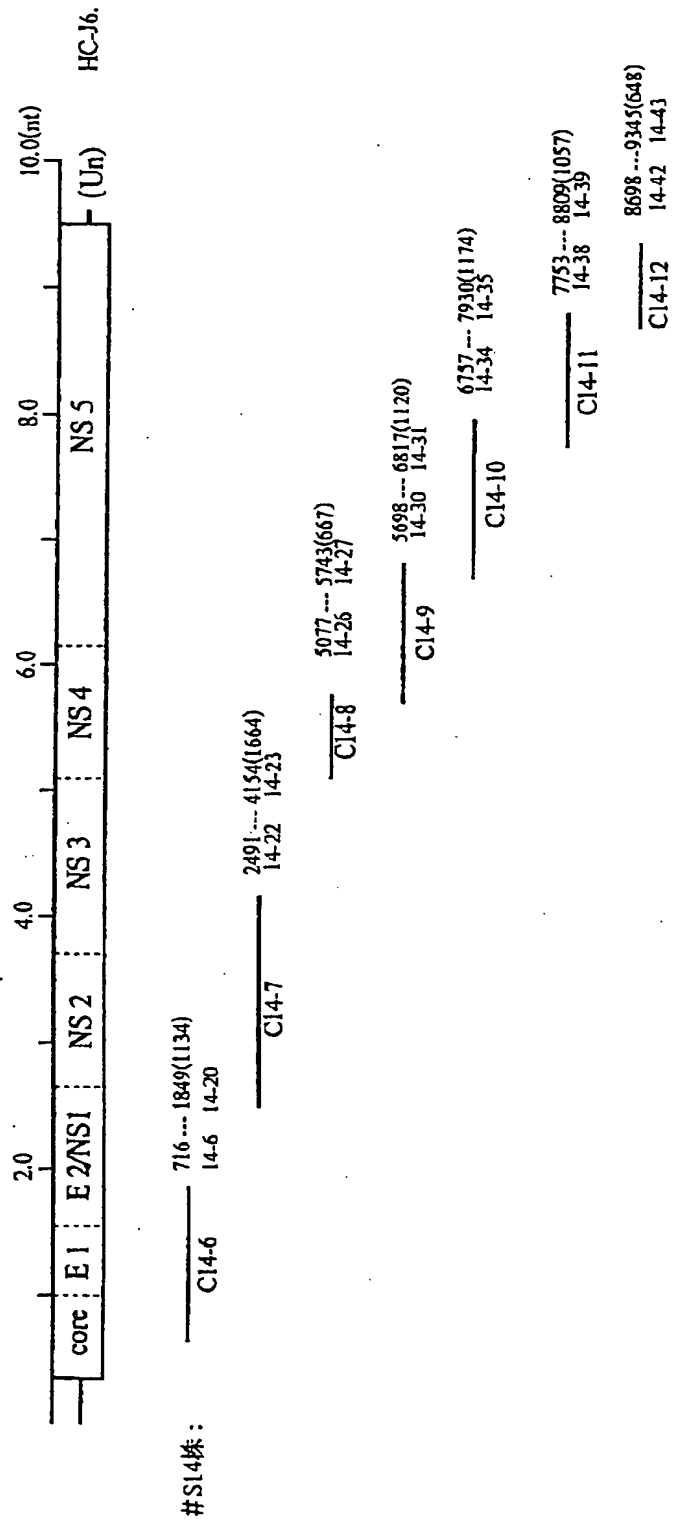
【図4】この図は、慢性非A非B型肝炎患者血清5例(No.1~No.5)と健常人血清5例(No.6~No.10)について本発明発現抗原(実施例3参照)を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す写真である。

【図5】この図は、慢性非A非B型肝炎患者血清5例(No.1~No.5)と健常人血清5例(No.6~No.10)について本発明発現抗原(実施例4参照)を用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す写真である。レーンMは分子量マーカを示す。

【図1】

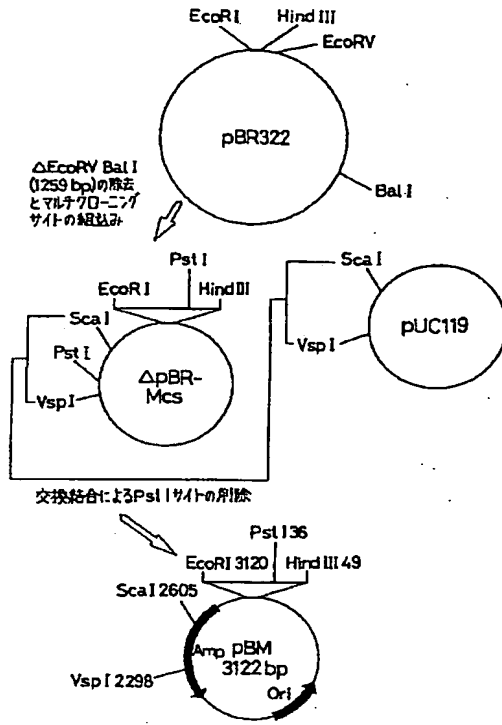


【図2】



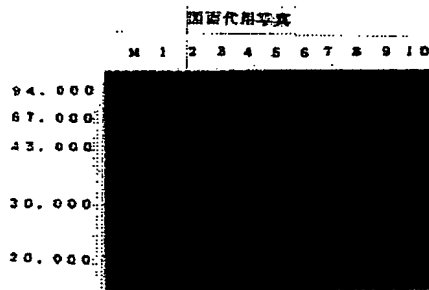
【図3】

図 3



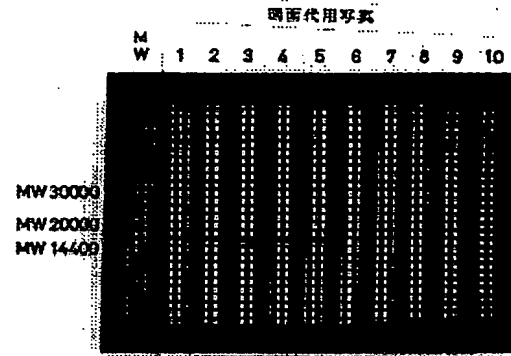
【図5】

図 5



【図4】

図 4



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
//(C 1 2 N 1/21 C 1 2 R 1:19) (C 1 2 P 21/02 C 1 2 R 1:19)				
(72) 発明者 野本 明男 東京都文京区本駒込三丁目18番22号 財団 法人 東京都臨床医学総合研究所内			(72) 発明者 三谷 隆彦 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内	
(72) 発明者 小原 道法 東京都文京区本駒込三丁目18番22号 財団 法人 東京都臨床医学総合研究所内			(72) 発明者 浅野 幸康 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内	
(72) 発明者 小原 恭子 東京都文京区本駒込三丁目18番22号 財団 法人 東京都臨床医学総合研究所内			(72) 発明者 槇 昇 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1 号 東燃株式会社総合研究所内	
(72) 発明者 澤井 喜一 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内			(72) 発明者 東 一博 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際 試薬株式会社研究開発センター内	
(72) 発明者 黒野 昌庸 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式 会社三和化学研究所内			(72) 発明者 森 浩之 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際 試薬株式会社研究開発センター内	
			(72) 発明者 太田 陽介 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際 試薬株式会社研究開発センター内	

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-070778

(43)Date of publication of application : 15.03.1994

(51)Int.CI.

```

C12N 15/51
C07K 13/00
C12N 1/21
C12P 21/02
//(C12N 1/21
C12R 1:19 )
(C12P 21/02
C12R 1:19 )

```

(21)Application number : 05-156087

(71)Applicant : TOKYO MET GOV RINSHIYOU
IGAKU SOGO KENKYUSHO
SANWA KAGAKU KENKYUSHO
CO LTD
TONEN CORP
INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : **01.06.1993**

(72)Inventor : **NOMOTO AKIO**
OBARA MICHINORI
OBARA KYOKO
SAWAI KIICHI
KURONO MASATSUNE
MITANI TAKAHIKO
ASANO YUKIYASU
MAKI NOBORU
AZUMA KAZUHIRO
MORI HIROYUKI
OTA YOSUKE

(30)Priority

Priority number : **04207391** Priority date : **10.07.1992** Priority country : **JP**

(54) NUCLEIC ACID FRAGMENT CODING NON-A, NON-B HEPATITIS VIRUS ANTIGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new nucleic acid fragment useful for production of an antigen (poly)peptide specific to a non-A, non-B hepatitis virus.

CONSTITUTION: This invention is a nucleic acid fragment obtained from plasma of a non-A, non-B hepatitis patient according to the gene engineering technique and containing a nucleotide sequence coding an antigen of the structural and non-structural zone of a non-A, non-B hepatitis virus, e.g. a nucleic acid fragment containing a nucleotide sequence coding a non-A, non-B hepatitis virus antigen of an amino acid sequence represented by the formula. RNA is extracted from plasma of a non-A, non-B hepatitis patient and a reverse transcriptase is allowed to

00
 01
 02
 03
 04
 05
 06
 07
 08
 09
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99

act thereon to obtain a cDNA. PCR is carried out by using two kinds of primers and the DNA is amplified.

TECHNICAL PROBLEM

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although a non-A-non-B-hepatitis patient's most portion has become diagnosable with the HCV antibody detection reagent which combined the antigen of the structure and the non-structure field of the second generation as mentioned above, the patient who cannot still detect with these reagents exists. What this cause depends on the non-A-non-B-hepatitis virus from which a type differs, and the thing completely depended on another pathogen factor is not clear.

[0008] Moreover, the cure of non-A-non-B-hepatitis patients, such as interferon medication, follows on appearing, and measurement of the gene and antigen which it not only detects an antibody, but are more meaningful for the judgment of a curative effect is desired strongly. However, it is also shown clearly that it has remarkable versatility in the field which it is especially shown clearly that the group from which a type differs exists in a non-A-non-B-hepatitis virus, and is presumed to be an envelope. It faces performing antibody measurement as an index of virus infection, antigen measurement, and gene measurement, it is thought that viral antigen and the versatility of a gene need to be taken into consideration, and it is thought that for that it is necessary to acquire as many the virogene and its manifestation product of a kind as possible.

[0009] The purpose of this invention is offering the new nucleic-acid fragment which carries out the code of the structure of a non-A-non-B-hepatitis virus, and the antigen of a non-structure field.

[0010] Another purpose of this invention is offering the expression vector containing this nucleic-acid fragment.

[0011] Still more nearly another purpose of this invention is offering the host cell containing this expression vector.

[0012] Other purposes of this invention are offering the manufacturing method of this antigen (poly) peptide that cultivates this host cell, is made to discover this nucleic-acid fragment, and is obtained.

MEANS

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, this invention person etc. succeeds in carrying out cloning of the non-A-non-B-hepatitis virogene which is different from the thing of a previous report from the inside of specific non-A-non-B-hepatitis patient plasma, and came to complete this invention.

[0014] In completing this invention, RNA is extracted from non-A-non-B-hepatitis patient plasma, reverse transcriptase is made to act, cDNA is obtained, and DNA is amplified by performing PCR (polymerase-chain-reaction; Science 230:1350 (1985)) using two kinds of primers. About the primer used on the occasion of amplification, it set up based on the array (J.Virol.65, 1105(1991); Proc.Natl.Acad.Sci.87:9524(1990);Virus Gene 5:3 243(1991);J.General Virol, and 72:2697 (1991)) of a previous report. Cloning of the amplified DNA was carried out using the claw NINKU vector which can be reproduced within Escherichia coli, and the nucleotide sequence was determined using the dideoxy chain stopping method (Science, 214, 1205 (1981)) of Sanger.

[0015] the above-mentioned method -- 14 kinds of clones -- obtaining -- Each C -- 14-1, C14-2, and C -- 14-3, C4-1, and C -- 4-2, C14-4, and C -- 14-5, C14-6, and C -- 14-7, C14-8, and C -- 14-9, C14-10, and C -- it was named 14-11 and C14-12 In addition, C14 and C4 are a series of clones obtained from the respectively independent patient. After importing 13 kinds of clones except C14-7 clone into 109 stocks of Escherichia coli jump on minus among 14 kinds of obtained clones, as a transformant -- respectively -- Fermentation Research Institute ***** 13029 a number -- said -- the 13030th a number -- said -- the 13031st a number -- said -- the 13027th a number -- said -- the 13028th a number -- said -- the 13032nd a number -- and -- said -- the 13033rd a number (above, deposition as of June 24, Heisei 4) -- and FERM P-13592 -- said -- P-13593 -- said -- P-13594 -- said -- P-13595 -- said -- P-13596 -- and -- said -- it ***** to National Institute of Bioscience and Human-Technology, the Agency of Industrial Science and Technology, as P-13597 (above, deposition as of April 9, Heisei 5)

[0016] As 14 kinds of obtained clones are shown in drawing 1 and drawing 2, C14-1 respectively by homology comparison with the nucleotide sequence of the non-A-non-B-hepatitis virogene of a previous report A part of 5' non-translating field and, and core region C14-3, C4-1, C4-2, and C14-5 NS3 field, C14-2/E2/NS1 field, C14-4/core/E1 field and C14-6/core/E1/E2/NS1 field and C14-7 -- NS2/NS3 field and C14-8 -- NS4/NS3 field and C14-9 -- NS4/NS5 field, C14-10, and C -- 14-11 and C14-12 were presumed to be NS5 fields the determined clone C -- 14-1, C14-2, and C -- 14-3, C4-1, and C -- 4-2, C14-4, and C -- 14-5, C14-6, and C -- 14-7, C14-8, and C -- 14-9, C14-10, and C -- the nucleotide sequence and presumed amino acid sequence of 14-11 and C14-12 It was shown in the array-among after-mentioned array table numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14, respectively.

[0017] The feature of each obtained clone is shown below.

[0018] (1) Clone It consists of C14 -1701 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 320-700 (127 amino acid), and are equivalent to a part of 5' non-translating field and, and core antigen field.

[0019] (2) Clone It consists of C14 -2910 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 1-909 (303 amino acid), and are equivalent to a part of E2-/NS1 field.

[0020] (3) Clone It consists of C14 -3852 nucleotide, and translation fields are 1-852 (284 amino acid), and are equivalent to a part of NS2 and NS3 antigen field.

[0021] (4) Clone It consists of C4 -1819 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 1-819 (273 amino acid), and are equivalent to a part of NS2 and NS3 antigen field.

[0022] (5) Clone It consists of C4 -2992 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 3-992 (330 amino acid), and are equivalent to a part of NS3 antigen field.

[0023] (6) Clone It consists of C14 -4596 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 1-594 (198 amino acid), and are equivalent to a part of core antigen field and E1 antigen field.
 core + 6 AA in E1

[0024] (7) Clone It consists of C14 -51143 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-1141 (380 amino acid), and are equivalent to a part of NS3 antigen field.

[0025] (8) Clone It consists of C14 -61134 nucleotide, and translation fields are the nucleotide

numbers 1-1134 (378 amino acid), and are equivalent to a part of E1 and core, and E2-/NS1 field.

[0026] (9) Clone It consists of C14 -71664 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-1663 (554 amino acid), and are equivalent to a part of E2/NS1 and NS2, and NS3 field.

[0027] (10) Clone It consists of C14 -8667 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-667 (222 amino acid), and are equivalent to a part of NS4 and NS3 field.

[0028] (11) Clone It consists of C14 -91120 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-1120 (373 amino acid), and are equivalent to a part of NS4 and NS5 field.

[0029] (12) Clone It consists of C14 -101174 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-1174 (391 amino acid), and are equivalent to a part of NS5 field.

[0030] (13) Clone It consists of C14 -111057 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-1057 (352 amino acid), and are equivalent to a part of NS5 field.

[0031] (14) Clone It consists of C14 -12648 nucleotide, and translation fields are the nucleotide numbers 2-646 (215 amino acid), and are equivalent to a part of NS5 field.

[0032] In addition, the coding region of a non-A-non-B-hepatitis viral genome consists of a structure field of a core/envelope, and a non-structure field (NS), and is arranged from 5' edge of a coding region in order of CORE, E1 and E2/NS1, NS2, NS3, NS4 and NS5 (J.Virology (1991), 65:1105-1113).

[0033] furthermore, the clone C -- 14-1, C14-2, and C -- 14-3, C4-1, and C -- 4-2, C14-4, and C -- 14-5, C14-6, and C -- 14-7, C14-8, and C -- 14-9, C14-10, and C -- the nucleotide sequence and presumed amino acid sequence of 14-11 and C14-12 HCV1 (Proc.Natl.Acad.Sci. (1991) --) of respectively a previous report 88:2451-2455 and HCVBK (it Virolog(ies) (1991) J. --) 65:1105 - 1113 and HCV-J1 (Proc.Natl.Acad.Sci. (1990) --) 87:9524-9528 and HC-J6 (it GeneralVirolog(ies) (1991).J. --) 72 : The result which compared 2697-2704, and the array of HC-J8 (Virology (1992), and 188:331-341) and a homology was shown in the following tables 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14.

[0034]

[Table 1]

Table 1 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-1/ HCV1 88.3 89.0 HCVBK 88.7 90.6 HCV-J1 88.3 90.6 HC-J6 96.3 95.3 HC-J8 91.0 92.1 [0035]

[Table 2]

Table 2 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-2/ HCV1 67.5 72.9 HCVBK 69.8 75.2 HCV-J1 69.5 72.9 HC-J6 90.7 90.8 HC-J8 74.4 86.5 [0036]

[Table 3]

Table 3 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-3/ HCV1 68.2 75.5 HCVBK 68.4 75.5 HCV-J1 68.5 76.2 HC-J6 91.8 97.5 HC-J8 75.7 88.7 [0037]

[Table 4]

Table 4 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C4-1/ HCV1 77.2 91.1 HCVBK 88.8 94.1 HCV-J1 90.4 93.8 HC-J6 67.8 73.6 HC-J8 66.6 74.6 [0038]

[Table 5]

Table 5 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C4-2/ HCV1 80.0 93.6 HCVBK 90.5 96.1 HCV-J1 91.3 94.2 HC-J6 71.8 86.1 HC-J8 72.2 85.2 [0039]

[Table 6]

Table 6 Homology (%) HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-4/ HCV1 65.8 70.2 HCVBK 66.3 65.7 HCV-J1 64.9 66.2 HC-J6 90.8 92.4 HC-J8 72.8 74.7 [0040]

[Table 7]

Table 7 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-5/ HCV1 73.6 86.3 HCVBK 72.0 86.1 HCV-J1 71.5 85.3 HC-J6 91.5 95.3 HC-J8 78.7 92.9 [0041]

[Table 8]

Table 8 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-6/ HCV1 65.2 67.2 HCVBK 65.5 62.8 HCV-J1 63.5 62.0 HC-J6 87.8 86.2 HC-J8 70.8 74.1 [0042]

[Table 9]

Table 9 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-7/ HCV1 62.7 66.1 HCVBK 63.1 66.6 HCV-J1 62.8 67.0 HC-J6 90.6 95.1 HC-J8 72.5 79.1 [0043]

[Table 10]

Table 10 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-8/
HCV1 68.0 73.0 HCVBK 66.0 69.8 HCV-J1 65.5 70.3 HC-J6 90.9 96.8 HC-J8 77.3 90.5 [0044]
[Table 11]

Table 11 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-9/
HCV1 66.7 68.8 HCVBK 67.7 72.1 HCV-J1 67.0 71.8 HC-J6 90.1 95.7 HC-J8 77.5 87.4 [0045]
[Table 12]

Table 12 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-10/
HCV1 55.8 58.8 HCVBK 54.6 58.8 HCV-J1 50.6 60.3 HC-J6 88.9 90.8 HC-J870.0 72.8 [0046]
[Table 13]

Table 13 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-11/
HCV1 69.8 76.4 HCVBK 69.7 76.4 HCV-J1 70.8 78.3 HC-J6 93.6 96.0 HC-J880.0 87.5 [0047]
[Table 14]

Table 14 Homology (%) A HCV gene All nucleotide sequences All amino acid sequences C14-12/
HCV1 67.6 72.6 HCVBK 67.2 73.0 HCV-J1 68.5 73.5 HC-J6 94.1 95.3 HC-J883.3 87.4 -- the
nucleotide sequence showed and the amino acid sequence showed 4.7 - 11.0% of difference 3.7 to
11.7% between these front twists and the non-A-non-B-hepatitis viro gene clone C14-1 was
announced officially, saying By 9.2-27.1%; clone C14-3, 9.3 to 32.5% clone C14-2, respectively
Moreover, 8.2 - 31.8%, In clone C4-1, respectively 2.5 - 24.5%; 9.6 - 33.4%, In clone C4-2,
respectively 5.9 - 26.4%; 8.7 - 28.2%, In clone C14-4, respectively 3.9 - 14.8%; 9.2 - 35.1%, In
clone C14-5, respectively 7.6 - 34.3%; 8.5 - 28.5%, In clone C14-6, respectively 4.7 - 13.9%; 12.2 -
36.5%, In clone C14-7, respectively 13.8 - 37.2%; 9.4 - 37.3%, In clone C14-8, respectively 4.9 -
33.4%; 9.1 - 34.5%, In clone C14-9, respectively 3.2 - 30.2%; 9.9 - 33.3%, In clone C14-10,
respectively 4.3 - 31.2%; 11.1 - 49.4%, 9.2 - 41.2%; by 4.0-23.6%; clone C14-12, 5.9 - 32.8% and
4.7 - 27.4% of difference was accepted 6.4 to 30.3% clone C14-11, respectively. In this, C4 and C14
stock indicate it to be the HCV stock released by present that it is another stock.

[0048] Therefore, this invention offers the new nucleic-acid fragment containing the nucleotide
sequence which carries out the code of the structure of the non-A-non-B-hepatitis virus obtained by
the genetic engineering-technique from non-A-non-B-hepatitis patient plasma, and the antigen of a
non-structure field.

[0049] the operative condition of this invention -- this nucleic-acid fragment contains more the
nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed
with all or a part of amino acid sequence shown in the array-among after-mentioned array table
numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, and 14 like Moreover, all the arrays based on the
degeneracy of a genetic code are included by this nucleotide sequence. All or part of arrays to the
nucleotide numbers 1-700 the example of such a nucleotide sequence is indicated to be to the array
number 1 All or part of arrays to the nucleotide numbers 1-909 shown in the array number 2 All or
part of arrays to the nucleotide numbers 1-852 shown in the array number 3 All or part of arrays to
the nucleotide numbers 1-819 shown in the array number 4 All or part of arrays to the nucleotide
numbers 3-992 shown in the array number 5 All or part of arrays to the nucleotide numbers 1-594
shown in the array number 6 All or part of arrays to the nucleotide numbers 2-1141 shown in the
array number 7 All or part of arrays to the nucleotide numbers 1-1134 shown in the array number 8
All or part of arrays to the nucleotide numbers 2-1663 shown in the array number 9 All or part of
arrays to the nucleotide numbers 2-667 shown in the array number 10 All or part of arrays to the
nucleotide numbers 2-1120 shown in the array number 11 All or part of arrays to the nucleotide
numbers 2-1174 shown in the array number 12 They are all of the arrays to the nucleotide numbers
2-1057 shown in the array number 13, or all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-646
shown in the array number 14 in part.

[0050] this invention offers the expression vector introduced into the cloning part in the vector to
which the above-mentioned nucleic-acid array exists in a promotor's lower stream of a river again.
Furthermore, this invention offers the host cell containing this expression vector.

[0051] As a vector, the viruses (for example, the vaccinia virus, a baculovirus, etc.) other than the
vector of common use, such as a plasmid and a phage, are used. It is decided by whether it
rearranges (poly) and a peptide has sugar chain structure to be obtained by DNA manifestation by
the kind of the promotor who can use it, and host. namely, -- the case where rearrange (poly) and it is

made for a peptide not to include sugar chain structure -- as a host -- for example, procaryotes, such as *Escherichia coli*, a *Bacillus subtilis*, and an *Actinomyces*, -- it can use -- moreover -- as a promotor -- for example, the tryptophan synthetase operon (*trp*), a lactose operon (*lac*), and the lambda phages PL and PR etc. -- it can use In this case, generally it will be obtained as a fusion object with other peptides. On the other hand, in rearranging (poly) and making it a peptide include sugar chain structure Eukaryotes, such as yeast, a plant cell, an insect cell, and an animal cell, are mentioned as a host. Moreover, the promotor to glycolysis enzymes, such as a promotor of the common use to yeast etc. as a promotor, for example, 3-phosphoglycerate kinase, and enolase, and the promotor to an alcohol dehydrogenase, The promotor of the origins, such as adenovirus, the virus promotor, for example, the polyoma virus, which may be used by the mammalian cell, ape virus simian virus 40, vaccinia virus, and a cytomegalovirus, is mentioned.

[0052] A vector may contain suitably the marker arrays (for example, an ampicillin, a tetracycline resistance gene, etc.) which make possible further phenotypic selection of the cell by which the transformation was carried out, the origin of replication, a terminator, a ribosome binding site, etc.

[0053] this invention offers the manufacture method of a recombination non-A-non-B-hepatitis viral-antigen (poly) peptide further. This method includes the process which specifically builds the expression vector which may make the above-mentioned nucleic-acid fragment of this invention discover within a suitable host cell, and which can be reproduced, the process which introduce the aforementioned expression vector in a host cell, and obtain a transformant, the process which the aforementioned transformant cultivates [process] under the conditions which may make the aforementioned nucleic-acid fragment discover, and make the aforementioned recombination (poly) peptide discover, and the process which collect the aforementioned recombination (poly) peptides.

[0054] The culture condition of a transformant is determined depending on the host cell to be used, and the culture medium which can be increased, cultivation temperature, cultivation time, etc. are chosen suitably. Moreover, the technology of common use, for example, ultrasonic spallation of a cell, solubilization extraction, ammonium sulfate fractionation, various chromatographies, etc. can perform refining of the recombination (poly) peptide from a culture.

[0055] A "recombination (poly) peptide" means a fusion (poly) peptide with the peptide itself or other peptides (poly) which are made to discover DNA which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen included in the expression vector, and are obtained (poly) among this specification.

[0056] The recombination (poly) peptide obtained by the above-mentioned method is also included by this invention. Such (poly) a peptide can also carry out chemosynthesis by using the peptide synthesis technology of common use, and this is things obvious at this contractor.

[0057] When [which was obtained by this invention] it rearranged and the polypeptide was made to react by the Western blot technique after SDS-polyacrylamide electrophoresis with a normal people blood serum and a non-A-non-B-hepatitis patient blood serum, as shown in drawing 4 and drawing 5, this recombination polypeptide reacted only with the non-A-non-B-hepatitis patient blood serum. Therefore, this recombination polypeptide is an antigen specific with a non-A-non-B-hepatitis virus, and is usable to a diagnosis of non-A non-B hepatitis, and detection of a non-A-non-B-hepatitis virus.

EXAMPLE

[Example] Although the following examples explain this invention to a detail further, this invention is not limited to these examples.

[0059] The plasma more nearly little than the plasma of the detection chronic-stage non-A-non-B-hepatitis patient of the HCV (#S14) gene by example 1 radiographic-PCR as a method of carrying out cloning of the HCV gene performed cloning of a HCV gene using radiographic(reverse transcriptase)-PCR method in which cloning is possible.

[0060] First, t-RNA(10mg/(ml)) 1microl of 200micro (6M guanidine thiocyanate, a 37.5mM sodium citrate, 0.75% ZARUKOSHIRU, 0.2M mercaptoethanol) of 6 GTC liquid l of M and yeast is added and agitated to 100micro (#S14) of non-A-non-B-hepatitis patient plasma l of a single chronic term. Furthermore, after adding 3M sodium acetate (pH 5.2) 20microl, TE saturation phenol (pH 7.5-8.0) 30microl, and chloroform / isoamyl alcohol (49:1) 70microl, mixing quickly and agitating for 10 seconds, it puts for 15 minutes into ice. a centrifuge -- 15000 rpm -- it carries out centrifugal at 4 degrees C for 20 minutes A water layer is taken, and it mixes with equivalent isopropyl alcohol, and puts on -20 degrees C for 1 hour or more. this -- 15000 rpm -- centrifugal is carried out and it is made to precipitate at 4 degrees C for 20 minutes It dissolves in GTC(what diluted 6M GTC with sterilized water)100microl of 4M, and mixes with equivalent isopropyl alcohol, and precipitate is gently put on -20 degrees C for 1 hour or more. 15000 For rpm and 20 minutes, carry out centrifugal at 4 degrees C, and obtain precipitate. It was air-dry after washing by ethanol 1ml 70% with the room temperature, dissolved in the sterilized water of 10microl, and was used as RNA.

[0061] After cDNA composition pours RNA10microl distributively in a siliconizing tube (0.5ml), 70 degrees C, it is heated for 3 minutes and quenched in Hikami. Next, RNase inhibitor (TAKARA SHUZO) 1microl (50 units /mul), dNTP(20 mM(s) each) 1microl, 100mMDTT, and 5xradiographic buffer (Tris-HCl (pH 8.5) 250mM [] --) 375mM(s) KCl, 15mM MgCl2 4microl, random oligo hexamer primer (100pmol/mul) 1microl, and 1micro (BRL) of reverse transcriptase l (200 units /mul) are added, and it doubles with a total of 20microl by the sterilized water. It heated for 5 minutes at 94 degrees C after the 2-hour reaction by 42-degrees C, and the enzyme was made to deactivate. PCR was performed using this cDNA. PCR used the 2 step method, in order to mention the amplification sensitivity and the singularity of Detection DNA. That is, 1st PCR is first applied by two sorts of primers (1st step PCR). Next, it is the method to which 2nd PCR is applied using two sorts of primers which exist inside the DNA array of the PCR product (2nd step PCR).

[0062] The primer was compounded about the field of 12 of C14-1 field, C14-2 field, C14-3 field, C14-4 field, C14-5 field, C14-6 field, C14-7 field, C14-8 field, C14-9 field, C14-10 field, C14-11 field, and C14-12 field, and it was used for the 2 step method. The PCR primer used for below is described. In addition, each field set the array (J.Virol.65, 1105-1113(1991); Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87, 9524-9528; (1990) Virus Genes 5:3, 243-259; (1991) J.General Virol.72, and 2697-2704 (1991)) of a previous report as reference. Moreover, the physical relationship of each amplification field and the array (HC-J6) of a previous report is shown in drawing 1 and drawing 2.

[0063] About C14-1 field, it is 1st. On the occasion of PCR, primer 14-1:5 '-CGATTGGGGGCGA-3' and 14-2:5'-TTGCAAAATTAACCCCGTCCTCCAG-3' is used, and it is 2nd. A primer 14-1 and 14-3:5'-CATGAGGTCGGCGAAGCCGC-3' were used for PCR.

[0064] About C14-2 field, it is 1st. PCR uses primer 14-8:5 '-CACCAATGGCAGTTGGCACATCAAC-3' and 14-9:5'-GGACTACCCGACCCTTGATGTACCA-3', and is 2nd. PCR used primer 14-10:5 '-CTGTTCTACACCCACAGCTTCAAC-3' and 14-11:5'-GCGTGCAAGACGACCAACTTCTCTA-3'.

[0065] About C14-3 field, it is 1st. PCR uses primer 14-12:5 '-GAGCGGAGACAGCTGCTTGCGGGGA-3' and 14-13:5'-ATAGGTGGAGTACGTGATGGG-3', and is 2nd. PCR used primer 14-14:5'-TTCCCGTGTCGCCCCGA-3' and 14-13.

[0066] About C14-4 field, it is 1st. PCR uses primer 14-4:5 '-TGGGCAGGATGGCTCCTGTC-3' and 14-5:5'-GCCGTTGTAGGTGACCAAGTTC-3', and is 2nd. PCR used primer 14-6:5'-TGGGTAAGGTCATCGATACC-3' and 14-5.

[0067] About C14-5 field, it is 1st. PCR uses primer 14-15:5'-CTGGTAGTGGAAAGAGCACCAAAGT-3' and 14-16:5'-TGCATGCACGTGGCGATGTA-3', and is 2nd. PCR used primer 14-17:5'-TCGCGTATGCCGCTCAGGGGTACAA-3' and 14-18:5'-GTCAGGGTAACCTCGTTGGTA-3'.

[0068] Furthermore, the PCR primer shown below was used about C14-6, C14-7, C14-8, C14-9, C14-10, C14-11, and C14-12 field.

[0069]

[Table 15]

C14-6 1st:5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTC-3'(14-4)
 5'-CTATCGGTCGTACCCACTAC-3'(14-19)
 2nd:5'-TGGGTAAGGTCATCGATACC-3'(14-6)
 5'-TGAAACAGTACACTGGGCCACACAC-3'(14-20)
 C14-7 1st:5'-ACCTGCCCGCCTTGTCGACTGGT-3'(14-21)
 5'-ATAGGTGGAGTACGTGATGGG-3'(14-13)
 2nd:5'-AAACATCGTGGACGTGCAAT-3'(14-22)
 5'-GAATTCTGATGCCATGTGCCTTGGACA-3'(14-23)
 C14-8 1st:5'-GGATACACCGGTGACTTTGA-3'(14-24)
 5'-CCCCAAAATGTTGAGAAGGATA-3'(14-25)
 2nd:5'-GATGCCCACTTCCTCTCCCA-3'(14-26)
 5'-GTGCTAGTTGACAACGGACTGGT-3'(14-27)
 C14-9 1st:5'-AACACATGTGGAACCTTCATCA-3'(14-28)
 5'-ATATGGGATGGGTCTGTTAGCATGGA-3'(14-29)
 2nd:5'-ACCTCGCAGGACTATCAACACTGCC-3'(14-30)
 5'-GATCGGAAGGGAGCTGAGACCCGAC-3'(14-31)
 C14-10 1st:5'-TAACGAGTGACAACCTTAA-3'(14-32)
 5'-AAGCTGCGGACCTCCTTAGCCCC-3'(14-33)
 2nd:5'-ACGGAGTGCAGATCCATAGGTTTGCCCC-3'(14-34)
 5'-TTGCAGAGTGGGGTGGAGTTAACTGGCA-3'(14-35)
 C14-11 1st:5'-GTCGTCTGCTGCTCAATGTC-3'(14-36)
 5'-GTGTCTAACTGTTTCCCAGGCAGCC-3'(14-37)
 2nd:5'-ATCAATCCGTTGAGCAACTC-3'(14-38)
 5'-TGGTAGGGTCTCTGGTCAGGTAGTN-3'(14-39)
 C14-12 1st:5'-CTAGCATGGGGAACACCATCACATG-3'(14-40)
 5'-TGTCTTTCATCCTCATCCGN-3'(14-41)
 2nd:5'-GAGCCTTCACGGAGGCTATGAC-3'(14-42)
 5'-TCGGGCACGCGACACGCTGTGATAN-3'(14-43)
 (N shows the mix of G, A, T, and C).

[0070] The conditions of PCR are 20microl, 10xPCR buffer-solution (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 500mMKCl, 15mM MgCl₂, and 0.1% gelatine) 8microl, and 1st about the above-mentioned cDNA composition reaction mixture in 0.5ml tube. Two sorts (75 pmole(s) each) of step primers, 2mM dNTP 8microl is added and it is made 100microl by the sterilized water. It heats for 10 minutes at 94 degrees C, and Ampli Taq1(Perkin-Elmer-Cetus) microl (five units) is added, after churning, multistory [of the mineral oil] is carried out and it carries out centrifugal lightly. a PCR reaction -- denaturation 94-degree-C for [1 minute] and annealing 55degree C -- the conditions for 1 minute and for [extension 72 degrees-C] 2 minutes -- 30 cycle ***** Next, it is 1st to new 0.5ml tube. 9micro of PCR reaction end liquid 10microl and 10xPCR buffer solutions 1 is added, and it is 2nd. Two sorts (75 pmole(s) each) of step primers, 2mM It is referred to as 100microl by dNTP9microl and the sterilized water. Ampli Taq 1microl (five units) is added, after churning, multistory [of the mineral oil] is carried out, centrifugal is carried out [it heats for 10 minutes at 94 degrees C, and] lightly, and they are 2nd(s) at previous conditions. PCR is performed. Agarose gel electrophoresis of the 10micro of the reaction mixture 1 was carried out after the reaction, and the DNA fragment amplified specifically was detected.

[0071] The determination HCV gene of cloning of a PCR product (DNA fragment of HCV#S14) and a base sequence was able to consider possibility that variation would be easy to be introduced at the

time of a duplicate. Then, in order to lessen artificial variation generated at the time of cloning as much as possible, the vector (pBM) which changed pBR322 (Sutcliffe, J.G., Cold Spring Harbor Symposium, 43, 77-90 (1979)) as a vector was used. pBM is the restriction enzyme EcoR of pBR322. From V site to Bal The deletion of the array between I sites is carried out by the restriction enzyme, and it is EcoR. It is EcoR of the multi-cloning site of pUC119 (Vieria, J., Messing, J., Methods in Enzymology, 153, and 3-11 (1987)) between I site and a Hind III site. From I site to the Hind III site was incorporated (deltapBR MCS). Next, Vsp of pBR322 From I site to Sca It is Sca from the VspI site of pUC119 about the array between I sites. It transposes to the array between I sites, and is Pst in the meantime. The deletion of the I site was carried out and the vector of overall-length 3122bp was produced (drawing 3).

[0072] The PCR reaction mixture by which DNA of HCV was detected mixed with the whole quantity with equivalent chloroform/isoamyl alcohol (24:1), moved the water layer to 0.5ml tube after centrifugal, added 3M sodium acetate (pH 5.2) of 1/10 amount, and the ethanol of quantitas duplex, and carried out ethanol precipitation. precipitate -- 10mM tris hydrochloric-acid-1mM EDTA(pH 7.4) (TE) 300microl -- dissolving -- ultra -- free -- centrifugal filtration was carried out in C3TK (Limited, Nihon Millipore), and residual primer removal and desalting were performed Processing liquid is 10xT4. DNA polymerase buffer-solution (30mM tris acetic-acid, 0.66M potassium acetate, 0.1M magnesium-acetate, 5mM DTT, 1mg/ml] BSA) 2microl, 2mM dNPT1microl and T4 DNA-polymerase 4 unit (TAKARA SHUZO) was added, it was referred to as 20microl in the sterilized water, and 12 degrees C reacted for 15 minutes. It extracted by a unit of 1 time after the reaction, respectively by equivalent phenol/chloroform (25:24), and chloroform/isoamyl alcohol (24:1), and ethanol precipitation of the water layer was carried out. It is air-dry after washing by ethanol 75%, and precipitate is 10x imidazole buffer-solution (0.5M imidazole hydrochloric-acid (pH 6.4), 0.18M magnesium chloride, 50mM DTT) 4microl and the 24% polyethylene glycol 6000. 10microl, 10mM ATP 0.5microl and T4DNA kinase (TAKARA SHUZO) 20 unit was added, and it was referred to as 40microl by the sterilized water, and 37 degrees C, it reacted for 1 hour and the five prime end was phosphorized. By chloroform / isoamyl alcohol processing, the enzyme was made to deactivate and the water layer was washed by ethanol 75% after ethanol precipitation. Precipitate isolated DNA by low melting point agarose gel electrophoresis, performed extraction twice by TE saturation phenol, dissolved in 10micro of sterilized waters 1 after washing by ethanol 75%, carried out [ethanol precipitation of the DNA fragment was carried out, and] agarose gel electrophoresis of the 1microl, and determined the amount of DNA fragments.

[0073] The DNA fragment obtained here is a restriction enzyme Sma beforehand. It cuts in I and ligation with the pBM vector which performed dephosphorization of the five prime end by alkaline phosphatase processing is performed.

[0074] In 50micro (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 7mM MgCl₂, 20mM KCl, Sma I(TAKARA SHUZO) 80 unit) of restriction enzyme reaction mixture 1, 30 degrees C, pBM (20microl) reacts for 90 minutes, and carries out after [15 minute heating] ethanol precipitation 68 degrees C. Precipitate was air-dried after washing by ethanol 75%, and the sterilized water was added to 10x alkaline phosphatase buffer-solution (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 1mM ZnCl₂, and 10mM MgCl₂) 5microl and alkaline phosphatase (beef-round-casing origin; TAKARA SHUZO) 1 unit, it was referred to as 50microl, and dephosphorization of the 37 degrees C was carried out by making it react for 1 hour. 500mM(s) The vector was isolated by the low melting point agarose gel electrophoresis after 56 degrees' C having reacted [so that EDTA(pH 7.5) 0.5microl and 10%SDS2.5microl may be added and it may become 50microg //ml / final concentration about Protease K further] for 30 minutes and making an enzyme deactivate, 2 times extraction was performed by TE saturation phenol, ethanol precipitation was carried out, and it dissolved after washing and air-drying and in 50micro of sterilized waters 1 by 75% ethanol. Agarose gel electrophoresis of the 1microl is carried out, the amount of vectors is determined, and it is Sma with a final concentration of 0.1microg [/ml]. It considered as I cloning vector.

[0075] The DNA fragment which phosphorized is Sma. As opposed to I cloning vector 25ng by the mole ratio From 15 times to 20 time ***** 10x ligation buffer solution (Tris-HCl (pH 7.6) 0.66M [] --) 50mM(s) MgCl₂, 50mM DTT2microl, 10mM hexamine cobalt chloride 2microl, BSA(1mg/

(ml)) 2microl, 10mMATP1microl, and T4 DNA ligase (TAKARA SHUZO) 350 unit were added, it was referred to as 20microl by the sterilized water, and overnight ligation was performed at 16 degrees C. tRNA(10mg/(ml))0.5microl was added to this reaction mixture, it washed by ethanol 75% after ethanol precipitation, the precipitate was dissolved in the sterilized water of 10microl, and the transformation of 109 stocks of Escherichia coli [one stock of] jump on minus and SCS was carried out using the moiety. The susceptibility Escherichia coli stock (competent cell) used for a transformation used what was prepared based on the previous report (J.Mol.Biol., 166, and 577 (1983)).

[0076] a transformation bacillus -- a LB-Amp plate (1% bacto trypton and 0.5% yeast extract --) 0.5% sodium chloride, 1.5% agar, and ampicillin 50microg/ml, after carrying out overnight cultivation in a top It is 3ml about the colony which appeared on the plate, respectively. It cultivates by 15ml tube containing LB-Amp. Centrifugal [of the 1.5ml culture medium] was carried out, it carried out the harvest, mini-PUREPARESHON (Maniatis and others, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, and 1982) of plasmid DNA was performed, and the DNA liquid of 15microl was prepared. It is a restriction enzyme EcoR about inside and 2-3microl. I and Hind III In four units each and 10micro (50 mMTris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaCl) of reaction buffer solutions I, agarose gel electrophoresis was performed and 37 degrees C of sizes of the inserted DNA fragment were checked, after making it react for 1 hour.

[0077] About 710 bp(s) and C14-2 field 12 field each About 950 bp(s), [C14-1] About 600 bp(s) and C14-5 field About 1200 bp(s), [C14-3 field] [about 850 bp(s) and C14-4 field] About 1134 bp (s) and C14-7 field About 1664 bp(s), [C14-6 field] About 1174 bp(s) and C14 -11 field were checked for about 1120 bp(s) and C14 -10 field, and the DNA fragment of about 648 bp(s) was checked [C14-8 field / about 667 bp(s) and C14-9 field] for about 1057 bp(s) and C14 -12 field, respectively.

[0078] 12 kinds of obtained DNA determined the base sequence using the dideoxy termination methods (Science, 214, and 1205-1210 (1981)), such as Sanger, further. Moreover, each field clone used for this DNA sequencing was named C14-1, C14-2, C14-3, C14-4, C14-5, C14-6, C14-7, C14-8, C14-9, C14-10, C14-11, and C14-12. Moreover, C14-1 makes the amino acid sequence presumed from the base sequence of a gene and it which were determined the array number 1. C14-2 -- the array number 2 and C14-3 -- the array number 3 and C14-4 -- the array number 6 and C14-5 -- the array number 7 and C14-6 -- the array number 8 and C14-7 -- the array number 9 and C14-8 -- the array number 10 and C14-9 -- the array number 11 and C14-10 -- the array number 12 -- C14-11 showed the array number 13 and C14-12 as an array number 14. For the above-mentioned plasmid, C14-1 is Fermentation Research Institute ***** 13029 as a transformant. Number, C14-2 -- said -- the 13030th a number and C14-3 -- said -- the 13031st a number and C14-4 -- said -- the 13032nd a number and C14-5 -- said -- the 13033rd Attach as a number on June 24, Heisei 4, and it comes out. C14-6 [moreover,] -- FERM P-13592 and C14-8 -- said -- P-13593 -- C14-9 -- said -- P-13594 and C14-10 -- said -- P-13595 and C14-11 -- said -- P-13596 and C14-12 -- said -- P-13597 ***** -- it attaches on April 9, Heisei 5, comes out, and *****s to National Institute of Bioscience and Human-Technology, the Agency of Industrial Science and Technology

[0079] radiographic-PCR of the HCV (#4) gene from single chronic non-A-non-B-hepatitis patient plasma which is different from the detection above-mentioned example 1 of the HCV (#4) gene by example 2 radiographic-PCR having shown in an example 1 by the same method was performed, and the amplification DNA fragment of C4-1 and C4-2 field was detected.

[0080] The used primer was shown below.

[0081] About C4-1 field, it is 1st. PCR uses primer 4-1:5 '-ATGGAGACTAAACTCATCAC-3' and 4-2:5'-ACTGTGCCGATGCCCAAGAT-3', and is 2nd. PCR used primer 4-3:5 '-TACTTCTAGGACCGGCCGAT-3' and 14-13:5'-ATAGGTGGAGTACGTGATGGG-3'.

[0082] About C4-2 field, it is 1st. PCR uses primer 4-4:5 '-TGGAGCGTATATGTCCAAGG-3' and 4-5:5'-GACATGCATGCCATGATGTA-3', and is 2nd. PCR used a primer 4-4 and 4-6:5'-CACATTTGGTCCCACGATGG-3'.

[0083] On the occasion of cloning of a PCR product, and determination cloning of a base sequence, using pUC119 as a vector, by the method which indicated the gene fragment amplified by PCR using the above-mentioned primer to be the SmaI site in the example 1, cloning was carried out and the

base sequence was determined. Moreover, each field clone used for this DNA sequencing was named C4-1 and C4-2. C4-1 made the amino acid sequence presumed from the base sequence of a gene and it which were determined the array number 4, and C4-2 were shown as an array number 5. the above-mentioned plasmid -- as a transformant -- C4-1 -- Fermentation Research Institute ***** 13027 a number and C4-2 -- said -- the 13028th It ***** on June 24, Heisei 4 as a number.

[0084] PCR was performed on the PCR conditions of an example 1 using primer B1:5'-CATGAGCATAAATCCTAAACCTCAAAG-3' and B2:5'-ATCTGCAGTTATAGGGTGTCTGATGACCTTACCC-3' using DNA of clone C14-1 obtained in the construction above-mentioned example 1 of the HCV (#S14) origin gene expression (the 1) a manifestation plasmid using example 3 Escherichia coli, and the DNA fragment of about 380 bp(s) was amplified. PCR reaction mixture processed the whole quantity by chloroform/isoamyl alcohol (24:1) by the method of an example 1, carried out ethanol precipitation of the water layer, after the dissolution, centrifugal **** of it was carried out, it performed residual primer removal and desalting to TE300microl, and phosphorylated the five prime end by T4DNA kinase processing after T4 DNA-polymerase processing. The obtained DNA fragment is Pst in the reaction buffer solution (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaCl). I20 unit was added and digested and low melting point agarose gel electrophoresis was performed. DNA was isolated, and by TE saturation phenol, after 2 times extraction, ethanol precipitation was carried out, and it dissolved in 10micro of sterilization water l, and refined as a DNA fragment of about 380 bp(s) from agarose gel. The DNA fragment obtained here is a restriction enzyme Pst at above-mentioned conditions beforehand about an expression vector pKK 223-3 (Pharmacia). It is a restriction enzyme Sma at the conditions which cut by I and were further shown in the example 1. It cut by I, T4 DNA ligase performed ligation on condition that the vector 25ng which performed dephosphorization of the five prime end by alkaline phosphatase processing, and the example 1, and the transformation was carried out using 105 stocks of Escherichia coli jump on minus.

[0085] It cultivates by 15ml tube into which 3ml LB-Amp went the colony which appeared on the plate after overnight cultivation, respectively on the LB-Amp plate (1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 0.5%NaCl, 1.5% agar, 50microg [/ml] ampicillin), and centrifugal [of the 1.5ml] is carried out, it carries out a harvest, and a transformation bacillus is mini-PUREPARESHON (Maniatis et al, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 1982) of plasmid DNA. It carried out and the DNA liquid of 15microl It is a restriction enzyme EcoR about inner 2-3microl. I and Pst In I four units each, and 10micro (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM NaCl) of reaction buffer solutions l, agarose gel electrophoresis was performed and 37 degrees C of clones in which the DNA fragment of about 380 bp(s) is inserted were obtained, after making it react for 1 hour.

[0086] b) After carrying out preculture of the 37 degrees C of the reaction above-mentioned Escherichia coli clones with the check of a manifestation and non-A-non-B-hepatitis patient blood serum by western blotting by the 3ml LB-Amp culture medium for 3 hours, the 50microl was inoculated into 5ml of new LB-Amp culture media, and was cultivated 37 degrees C for 2 hours. IPTG (Wako Pure Chem) was added so that it might be set to final concentration 2mM to culture medium, and 37 more degrees C was cultivated for 3 hours. 1.5ml of culture medium -- 13000rpm and the 2-minute heart at long intervals -- carrying out -- after a harvest and TE1ml -- a bacillus -- washing -- 13000 rpm -- the at-long-intervals heart was carried out for 2 minutes, and the harvest was carried out again The sterilized water of 50microl and 2x sample buffer solution (100mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 10%SDS, a 5% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromphenol blue) of 50microl were added to the pellet which carried out the harvest, suspension mixing was carried out, suspension was ultrasonicated under 100 degrees C and after [boiling during 5 minutes] ice-cooling, and freeze thawing was made twice into the repeat sample at -70 degrees C.

[0087] It is MINI about the above-mentioned sample 30microl. PROTEAN II Dual According to the method (Nature, 227, 680 (1970)) of Laemmli, 15mA and 1.5-hour SDS polyacrylamide gel electrophoresis were performed using SlabCell (Biorad). Gel is taken out after migration, a PVDF membrane (Millipore) is stuck, and it is MINI. TRANS BLOT Electrophoretic Transfer 250mA was imprinted for 1.75 hours using Cell (Biorad). After the imprint, it was immersed in 5% skim milk and buffer-solution [which contains BSA 2%] I' (10mM Na-phosphate (pH 7.0), 1%BSA, 0.15M NaCl, 2.5mM EDTA), and the membrane was blocked at the room temperature for 2 hours. The

membrane blocked in the blood serum sample diluted with 5% skim milk and buffer-solution [which contains BSA 2%] I' 40 times was put in, and it was made to react at a room temperature for 4 hours. The membrane was put into the anti-man IgG-POD labelled antibody liquid (goat antibody) diluted with buffer-solution I' which contains skim milk 2% after 3 times washing to 100 μ (s)/ml with the buffer solution II (10mM Na-phosphate (pH 7.0), 0.15M NaCl, 0.05%Tween20), and was made to react for 30 minutes at a room temperature after a reaction. The membrane was taken out after the reaction and the buffer solution II washed 5 times. It flooded with coloring liquid (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.05%4-chloro 1 naphthol, 0.018%H₂ O₂, 16.7% methanol), and the washed membrane was made to react for 15 minutes at a room temperature.

[0088] The result was shown in drawing 4 . It sets to drawing 4 and they are five un-A un-B type chronic-hepatitis patient blood serums (No.1-No.5). Although the result which performed western blotting about five healthy people blood serums (No.6-No.10) was shown, it was shown that the antigen which the positive reaction strong against all was detected and was discovered only by the non-A-non-B-hepatitis patient blood serum is useful to a diagnosis of a non-A-non-B-hepatitis patient and detection of a non-A-non-B-hepatitis virus carrier.

[0089] In the construction example 1 of the HCV (#S14) origin gene expression (the 2) a manifestation plasmid using example 4 Escherichia coli Obtained DNA of clone C14-3 and C14-5 is digested by restriction enzymes EcoRI, PstI, and EcoRI in the buffer solution (Takara Universal buffer H), respectively. The DNA fragment of about 930 bp(s) and about 950 bp(s) was isolated by agarose gel electrophoresis, respectively, and after TE saturation phenol and chloroform processing, ethanol precipitation was carried out and it refined by dissolving in 25micro of sterilized waters l. Each refined DNA was digested by the restriction enzyme ScaI in the above-mentioned buffer solution, respectively, DNA of about 780 bp(s) and 920bp(s) was isolated by agarose gel electrophoresis, respectively, and it refined by carrying out ethanol precipitation after TE saturation phenol and chloroform processing. Two kinds of refined DNA and the vector pBluescript digested by the restriction enzyme EcoRI are beforehand mixed among the above-mentioned buffer solution, and it is T4. The DNA ligase performed ligation and the transformation was carried out using 109 stocks of Escherichia coli jump on minus.

[0090] The transformation bacillus was cultivated by 15ml tube into which 3ml LB-Amp went the colony which appeared on the plate after cultivation overnight on the LB-Amp plate (1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 1%NaCl, 1.5% agar, 50microg [/ml] ampicillin), respectively, carried out the harvest of the 1.5ml by centrifugal processing, performed mini-PUREPARESHON (Maniatis et al, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 1982) of a plasmid, and prepared the DNA liquid of 20microl. The clone (28-14D) in which the DNA fragment of about 1700 bp(s) is inserted was obtained by digesting and carrying out agarose gel electrophoresis of the 4microl of the prepared DNA liquid in [EcoRI] the buffer solution (Takara Universal Buffer H). The PCR reaction was performed using primer F2:5 '-CAGAATTCATGGAAACACTCGACATCGCC-3' and primer R:5'-CACTGCAGTTATGAGACAGCGTCTTGAGGGAC-3' using DNA of this clone 28-14D. a PCR reaction -- the above-mentioned DNA 1microl -- the 10xPCR buffer solution (Tris-HCl (pH 8.3) 100mM [] --) 500mM(s) KCl, 15mM MgCl₂, 0.1%geratine5microl, Primers F2 and R (240 pM(s) each), 25mM dNTP 0.2microl, Taq after adding polymerase(Boehringer)0.2microl (one unit) and being referred to as 50microl by the sterilized water -- agitating -- a mineral oil -- multistory -- carrying out -- denaturation 94-degree-C for [0.5 minutes] and annealing 55degree C -- the conditions for 0.5 minutes and for [extension 72 degrees-C] 1 minute -- 44 cycle ***** the whole quantity of after a reaction and reaction mixture -- TE saturation phenol -- and chloroform processing was carried out, ethanol precipitation of the water layer was carried out, it dissolved in 40micro of sterilized waters l, and buffer-solution (Takara Universal Buffer H) 5microl, restriction enzyme EcoRI20 unit, and PstI20 unit were added and digested The DNA fragment of about 860 bp (s) was isolated by agarose gel electrophoresis after [digestion] 1.5%, after [chloroform processing] ethanol precipitation was carried out, and Refining DNA was obtained TE saturation phenol and by dissolving in the sterilized water of 5microl. The DNA fragment obtained here cut beforehand the expression vector pKK 223-3 (Pharmacia) by restriction enzymes EcoRI and PstI, and it mixed with 1micro of objects l refined on condition that the ****, the 1microl was connected by T4 DNA ligase, and it carried out the transformation using 109 stocks of Escherichia coli jump on

minus.

[0091] The transformation bacillus was cultivated by 15ml tube into which 3ml LB-Amp went the colony which appeared on the plate after cultivation overnight on the LB-Amp plate (1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 1%NaCl, 1.5% agar, 50microg [/ml] ampicillin), respectively, carried out the harvest of the 1.5ml by centrifugal processing, performed mini-PUREPARESHON (Maniatis et al, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 1982) of a plasmid, and prepared the DNA liquid of 20microl. The clone in which the DNA fragment of about 860 bp(s) is inserted was obtained by digesting and carrying out agarose gel electrophoresis of the 4microl of the prepared DNA liquid in [EcoRI and PstI] the buffer solution (Takara Universal Buffer H).

[0092] b) After carrying out preculture of the 37 degrees C of the reaction above-mentioned Escherichia coli clones with the check of a manifestation and non-A-non-B-hepatitis patient blood serum by western blotting by the 3ml LB-Amp culture medium for 3 hours, the 50microl was inoculated into 5ml of new LB-Amp culture media, and was cultivated 37 degrees C for 2 hours. IPTG (Wako Pure Chem) was added so that it might be set to final concentration 2mM to culture medium, and 37 more degrees C was cultivated for 3 hours. 1.5ml of culture medium -- 13000rpm and the 2-minute heart at long intervals -- carrying out -- after a harvest and TE1ml -- a bacillus -- washing -- 13000 rpm -- the at-long-intervals heart was carried out for 2 minutes, and the harvest was carried out again The sterilized water of 50microl and 2x sample buffer solution (100 mMTris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 10%SDS, a 5%2-mercaptoethanol, 0.2% bromphenol blue) of 50microl were added to the pellet which carried out the harvest, suspension mixing was carried out, suspension was ultrasonicated under 100 degrees C and after [boiling during 5 minutes] ice-cooling, and freeze thawing was made twice into the repeat sample at -70 degrees C.

[0093] It is MINI about the above-mentioned sample. PROTEAN II Dual Slab According to the method (Nature, 227, 680 (1970)) of Laemmli, 15mA and 1.5-hour SDS polyacrylamide gel electrophoresis were performed using Cell (Biorad). Gel is started after migration, a PVDF membrane (Millipore) is stuck, and it is MINI. TRANS BLOT Electrophoretic Transfer 250mA was imprinted for 1.75 hours using Cell (Biorad). After the imprint, it was immersed in 5% skim milk and buffer-solution [which contains BSA 2%] I' (10mM Na-phosphate (pH 7.0), 1%BSA, 0.15M NaCl, 2.5mM EDTA), and the membrane was blocked at the room temperature for 2 hours. The membrane blocked in the blood serum sample diluted with 5% skim milk and buffer-solution [which contains BSA 2%] I' 40 times was put in, and it was made to react at a room temperature for 4 hours. The membrane was put into the anti-man IgG-POD labelled antibody liquid (goat antibody) diluted with buffer-solution I' which contains skim milk 2% after 3 times washing to 100 mu(s)/ml with the buffer solution II (10mM Na-phosphate (pH 7.0), 0.15MNaCl, 0.05%Tween20), and was made to react for 30 minutes at a room temperature after a reaction. The membrane was taken out after the reaction and the buffer solution II washed 5 times. It flooded with coloring liquid (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5M NaCl, 0.05%4-chloro 1 naphthol, 0.018%H2 O2, 16.7% methanol), and the washed membrane was made to react for 15 minutes at a room temperature.

[0094] The result was shown in drawing 5 . It sets to drawing 5 and they are five un-A un-B type chronic-hepatitis patient blood serums (No.1-No.5). Although the result which performed western blotting about five healthy people blood serums (No.6-No.10) was shown, it was shown that the antigen which the positive reaction strong against all was detected and was discovered only by the non-A-non-B-hepatitis patient blood serum is useful to a diagnosis of a non-A-non-B-hepatitis patient.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the structure of the non-A-non-B-hepatitis virus obtained by the genetic engineering-technique from non-A-non-B-hepatitis patient plasma, and the antigen of a non-structure field.

[Claim 2] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 1.

[Claim 3] The nucleic-acid fragment according to claim 2 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-700 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 1.

[Claim 4] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 2.

[Claim 5] The nucleic-acid fragment according to claim 4 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-909 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 2.

[Claim 6] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 3.

[Claim 7] The nucleic-acid fragment according to claim 6 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-852 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 3.

[Claim 8] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 4.

[Claim 9] The nucleic-acid fragment according to claim 8 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-819 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 4.

[Claim 10] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 5.

[Claim 11] The nucleic-acid fragment according to claim 10 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 3-992 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 5.

[Claim 12] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 6.

[Claim 13] The nucleic-acid fragment according to claim 12 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-594 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 6.

[Claim 14] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 7.

[Claim 15] The nucleic-acid fragment according to claim 14 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-1141 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 7.

[Claim 16] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 8.

[Claim 17] The nucleic-acid fragment according to claim 16 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 1-1134 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 8.

[Claim 18] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code

of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 9.

[Claim 19] The nucleic-acid fragment according to claim 18 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-1663 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 9.

[Claim 20] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 10.

[Claim 21] The nucleic-acid fragment according to claim 20 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-667 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 10.

[Claim 22] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis virus antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 11.

[Claim 23] The nucleic-acid fragment according to claim 22 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-1120 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 11.

[Claim 24] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 12.

[Claim 25] The nucleic-acid fragment according to claim 24 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-1174 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 12.

[Claim 26] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 13.

[Claim 27] The nucleic-acid fragment according to claim 26 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-1057 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 13.

[Claim 28] The nucleic-acid fragment containing the nucleotide sequence which carries out the code of the non-A-non-B-hepatitis viral antigen expressed with all or a part of amino acid sequence shown in the array number 14.

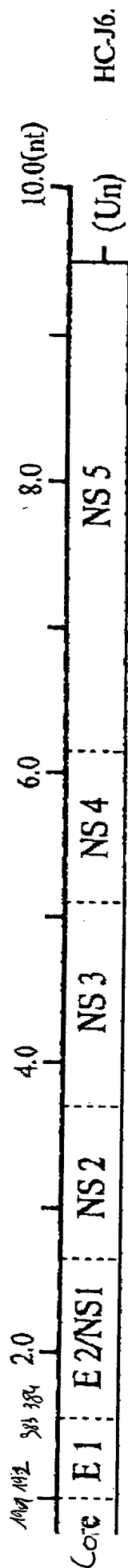
[Claim 29] The nucleic-acid fragment according to claim 28 which are all or a part of arrays to the nucleotide numbers 2-646 the aforementioned nucleotide sequence is indicated to be to the array number 14.

[Claim 30] The expression vector introduced into the cloning part in the vector to which a nucleic-acid fragment given in any 1 term of claims 1-29 exists in a promotor's lower stream of a river.

[Claim 31] The host cell containing an expression vector according to claim 30.

[Claim 32] It is the manufacture method of a recombination non-A-non-B-hepatitis viral-antigen (poly) peptide. The process which builds the expression vector which may make any 1 term of claims 1-29 discover the nucleic-acid fragment of a publication within a suitable host cell, and which can be reproduced, How to include the process which introduces the aforementioned expression vector in a host cell, and obtains a transformant, the process which the aforementioned transformant is cultivated [process] under the conditions which may make the aforementioned nucleic-acid fragment discover, and makes the aforementioned recombination (poly) peptide discover, and the process which collects the aforementioned recombination (poly) peptides.

[Claim 33] It is obtained by the method according to claim 32, rearranges (poly), and is a peptide.



22---722(701)
14.1 14.3

8-240

239-437

716---1311(596)
14.6 14.5

1685---2594(910)
14.10 14.11

C14-2

3368---4219(852)
14.14 14.13

C14-3

4102---5244(1143)
14.17 14.18

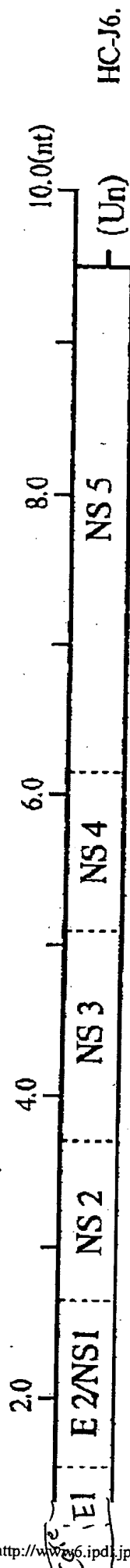
C14-5

3401---4219(819)
4.3 14.13

C4-1

4164---5155(992)
4.4 4.6

C4-2



716 --- 1849(1134)
14-6 14-6 14-20

2491 --- 4154(1664)
14-22 14-23

5077 --- 5743(667)
14-26 14-27

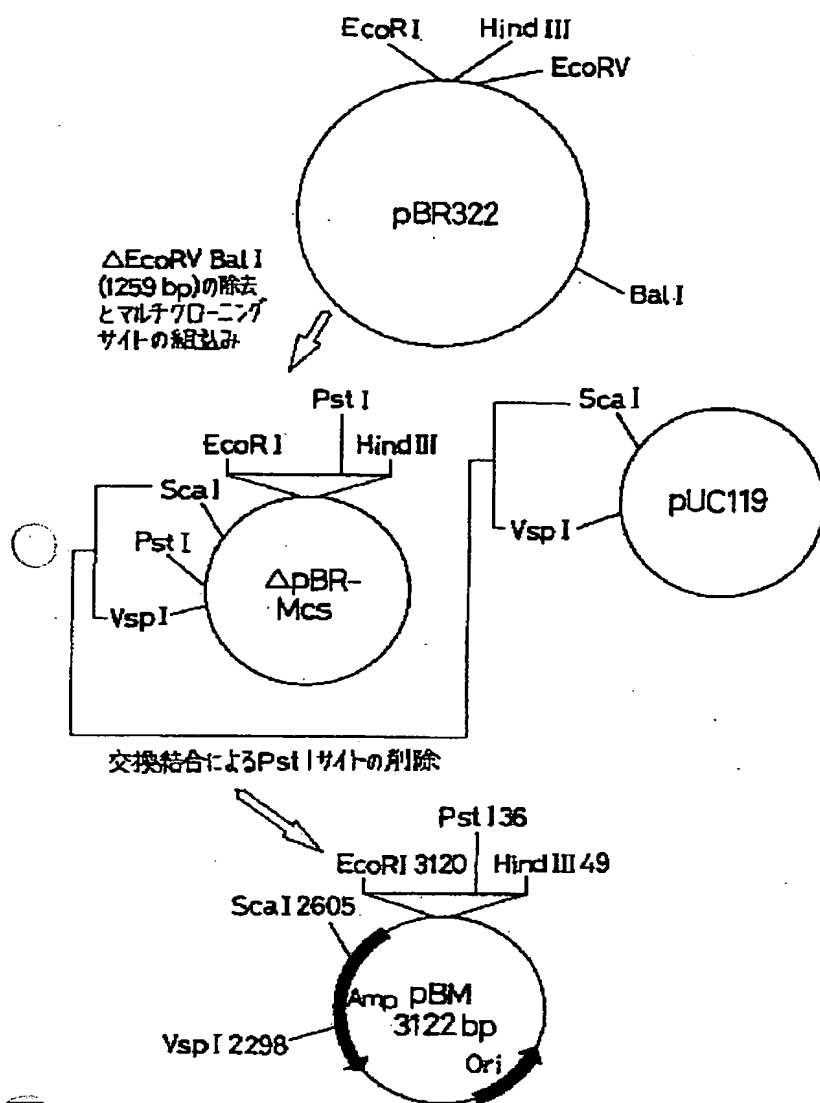
5698 --- 6817(1120)
14-30 14-31

6757 --- 7930(1174)
14-34 14-35

7753 --- 8809(1057)
14-38 14-39

8698 --- 9345(648)
14-42 14-43

図 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ ~~SKEWED/SLANTED IMAGES~~
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.